Série A, N° 2688
N° d'ordre : 3560

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Bernadette BERGERET

1re Thèse — **Décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique chez les animaux supérieurs.**

2e Thèse — **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 16 Juin 1954 devant la Commission d'Examen.

MM. AUBEL, *Président,*

FROMAGEOT, CHOUARD } *Examinateurs.*

Série A, N° 2688
N° d'ordre : 3560

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Bernadette BERGERET

1re Thèse — **Décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique chez les animaux supérieurs.**

2e Thèse — **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 16 Juin 1954 devant la Commission d'Examen.

MM. AUBEL, *Président,*

FROMAGEOT, CHOUARD } *Examinateurs.*

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552216_0014

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen : M. J. PÉRÈS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
A. DENJOY	T	Théorie des Fonctions.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et Géologique dynamique.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.
Robert LÉVY	T	Physiologie comparée.
FOCH	T	Mécanique physique et expérimentale.
PAUTHENIER	T	Electrotechnique générale.
De BROGLIE	T	Théories physiques.
JOB	T	Chimie générale.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
GARNIER	T	Géométrie supérieure.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.
LAUGIER	T	Physiologie générale.
M. CURIE	T	Physique (P.C.B.).
G. RIBAUD	T	Hautes températures.
CHAZY	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
CROZE	T	Physique théorique et physique céleste.
DUPONT	T	Théories chimiques.
BARRABÉ	T	Géologie structurale et géologie appliquée.
G. DARMOIS	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.
Jacques BOURCART	T	Géographie physique et Géologie dynamique.
AUBEL	T	Chimie biologique.
Mme JOLIOT-CURIE	T	Physique générale et Radioactivité.
PLANTEFOL	T	Botanique.
CABANNES	T	Recherches physiques.
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.
WYART	T	Minéralogie.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER		Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Géologie.
ROCARD	T	Physique.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E.N. Supérieure).
LAFFITTE	T	Chimie générale.
FAVARD	T	Mécanique générale.
COULOMB	T	Physique du Globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale (P.C.B.).
CHRETIEN	T	Chimie minérale.
P. DRACH	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique.
EPHRUSSI	T	Génétique.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.
RIVIERE	T	Géologie (P.C.B.).
GAUTHERET	T	Biologie végétale (P.C.B.).
LUCAS	T	Physique.
A. THOMAS	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MAX MORAND		Physique.
SOLEILLET	T	Physique.
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.
DANJON	T	Astronomie.
FROMAGEOT	T	Chimie biologique.
LAPORTE	T	Physique générale et Radioactivité.
JANET	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.
PETIT	T	Biologie maritime.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.
GALLIEN	T	Biologie animale (P.C.B.).
EICHHORN	T	Biologie végétale (P.C.B.).
De CUGNAC		Biologie végétale (P.C.B.).
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie-Physique.
THELLIER	T	Physique du Globe.
AUDUBERT	T	Electrochimie.
L'HÉRITIER	T	Génétique.
GRIVET	T	Radio-Electricité.
PONCIN	T	Mécanique des fluides.
THIRY	T	Mécanique appliquée.
DUBREIL	T	Mathématiques générales.
QUELET	T	Chimie (P.C.B.).
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Géologie structurale et Géologie appliquée.
JUNG	T	Pétrographie.
TRILLAT	T	Chimie-Physique.
WIEMANN	T	Chimie (P.C.B.).
JACQUINOT	T	Physique (P.C.B.).
VASSY		Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES		Théories physiques.
M. PRUVOST	T	Géologie.
AMIEL	T	Chimie (P.C.B.).
HOCART	T	Minéralogie.
J.-P. MATHIEU	T	Physique (P.C.B.).
COUTEAUX		Biologie animale (P.C.B.).
MAY		Biologie animale (P.C.B.).
CHOQUET	T	Calcul différentiel.
FELDMANN		Biologie (P.C.B.).
GUINIER	T	Physique (P.C.B.).
JOST	T	Biologie (P.C.B.).
PORTET		Calcul des probabilités.
SCHWARTZ	T	Méthode mathématique de la Physique.
MALAVARD	T	Aviation.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
BRELOT	T	Calcul différentiel.
NORMANT	T	Chimie (P.C.B.).
BÉNARD		Chimie (P.C.B.).
BUVAT		Botanique (E.N.S.).
DUGUÉ		Statistique mathématique.
GELOSO		Chimie (P.C.B.).
MARÉCHAL		Optique théorique et appliquée.
SOULAIRAC		Psychophysiologie.
ULRICH		Physiologie végétale.

Secrétaire : M. Ch. MONIER

Ce travail a été exécuté au Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris. Le sujet m'a été proposé par Monsieur le Professeur FROMAGEOT qui voudra bien trouver ici l'expression de ma gratitude. Je remercie vivement tous mes camarades de laboratoire qui m'ont aidée au cours de mes recherches. Je tiens à remercier tout particulièrement Fernande CHATAGNER avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration tant sur le plan expérimental que sur le plan théorique.

Enfin, je remercie le Centre National de la Recherche Scientifique de l'aide matérielle qui m'a permis d'entreprendre et de continuer mes recherches.

INTRODUCTION

L'acide cystéinesulfinique $SO_2H - CH_2 - CH\begin{cases} NH_2 \\ COOH \end{cases}$ a été reconnu par Pirie dès 1934(1) comme devant être un intermédiaire dans la dégradation des acides aminés soufrés, et plus spécialement dans la formation de sulfates, chez les animaux supérieurs. Son rôle a également été admis par Medes et Floyd (2) sans pourtant que ces auteurs aient pu le caractériser dans les tissus et sans qu'ils aient étudié son métabolisme propre. Toutefois, depuis quelques années, le sort de l'acide cystéinesulfinique a été bien étudié: chez l'animal vivant aussi bien que dans les préparations d'organes (3), cet acide aminé subit essentiellement deux réactions.

- une transamination désulfinante, aboutissant à la formation d'alanine et de sulfite, ultérieurement oxydé en sulfate (4), ce qui explique la genèse des sulfates.

- une décarboxylation, donnant naissance à l'hypotaurine ou acide 2 aminoéthane sulfinique, qui prend certainement part à la genèse de la taurine dans l'organisme (5).

La réalité de l'existence de l'acide cystéinesulfinique comme intermédiaire d'oxydation des substances soufrées est appuyée, non seulement sur le fait qu'il constitue un métabolite de choix, mais encore parce que ses produits de dégradation : hypotaurine et alanine, sont retrouvés par plusieurs auteurs dans les organes ou l'urine d'animaux recevant de la cystéine ou de la cystine: d'une part, Awapara a mis en évidence la présence d'alanine (6) et d'hypotaurine (5) à la suite d'injections intraveineuses de cystéine à des rats, d'autre part, Cavallini a retrouvé de l'hypotaurine (7) dans l'urine de rats soumis à une alimentation riche en cystine.

Il est pourtant assez remarquable que cet acide cystéinesulfinique, auquel on attribue un rôle important, n'ait pu être caractérisé dans aucun organe étudié jusqu'à présent. Ceci semble dû à sa rapidité de transformation dans le foie, et même dans le rein (8), au moins chez le rat.

Dans le présent travail, nous avons réussi à caractériser l'acide cystéinesulfinique dans le tissu du rat normal. Nous avons étudié avec quelque détail la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique et ses relations avec le phosphate de pyridoxal. L'isolement en nature du produit de décarboxylation, l'hypotaurine, qui jusqu'ici n'avait été caractérisée que par chromatographie sur papier, a été réalisé. Enfin, nous avons tenté d'établir un parallèle sur la nature et les vitesses des dégradations subies par l'acide cystéique et par l'acide cystéinesulfinique : transamination et décarboxylation, pour expliquer la genèse des sulfates et de la taurine dans l'organisme.

T E C H N I Q U E S

La plupart des techniques utilisées dans notre travail sont des techniques connues, que nous avons appliquées sans modification; toutefois, dans certains cas, et en particulier en ce qui concerne la séparation d'acides aminés soufrés sur échangeurs d'ions, nous avons dû mettre au point nous-mêmes des méthodes nous permettant de réaliser le dosage quantitatif des substances contenues dans nos milieux de réaction.

A - Synthèse de l'acide L-cystéine-sulfinique -

Nous avons préparé l'acide l-cystéine-sulfinique selon la méthode de Lavine (9) en réalisant d'abord la synthèse du cystine-disulfoxyde, par oxydation du perchlorate de cystine en milieu anhydre (acétonitrile) par l'acide perbenzoïque; la dismutation ultérieure du cystine disulfoxyde en milieu ammoniacal donne naissance à l'acide cystéine-sulfinique (et à la cystine qui, insoluble en milieu neutre, est éliminée facilement). Tous les détails expérimentaux relatifs à cette synthèse, ainsi que les légères modifications apportées à la technique de Lavine, ont été décrits par F. Chatagner (3).

B - Préparation des milieux enzymatiques -

Après avoir été maintenus au jeûne pendant 24 heures, les animaux sont sacrifiés, par section de la carotide pour le lapin, par décapitation pour le rat. Les organes sont prélevés immédiatement et refroidis. Le foie du lapin est généralement perfusé à l'aide d'une solution physiologique à 0,9 % de chlorure de sodium refroidie à 4º. Les organes sont ensuite broyés à la chambre froide, soit au Turmix quand ils sont suffisamment importants (foie et reins de lapin), soit au mortier en présence d'un peu de sable de Fontainebleau purifié (cerveau et organe du rat).

Dans le cas où l'on utilise directement les organes frais, on ajoute au broyat de l'eau distillée refroidie, de façon à obtenir une suspension, diluée de 2 à 10 fois par rapport au volume initial de l'organe, selon l'activité enzymatique de ce dernier.

Pour la préparation de poudres acétoniques, qui ont été réalisées seulement à partir du foie de lapin, on ajoute au broyat, en 2 fois, 5 fois son volume d'acétone anhydre préalablement refroidie à -15º. Le précipité acétonique est filtré sur Büchner à la chambre froide, séché quelques heures sous vide à la température ordinaire; la poudre est conservée à -15º. Au moment de l'emploi, la poudre est agitée à froid pendant 30 minutes avec 10 fois son volume d'eau distillée froide. On centrifuge et on recueille le liquide surnageant.

Les milieux enzymatiques sont souvent dialysés à 4º, pendant 24 heures, sous agitation, contre une solution de bicarbonate de sodium à 100 mg par litre (pour prévenir l'abaissement du pH pendant la dialyse).

C - Traitement des animaux carencés en vitamine B_6

De jeunes rats (Wistar) pesant entre 60 et 80 g. sont séparés en deux groupes de chacun dix animaux. Chaque animal reçoit par jour 10 g. d'un régime comprenant : 18% de caséine dévitaminée spéciale (Byla); 73% de saccharose; 5% de graisse (huile végétale hydrogénée, Astra); 4% du mélange de sels (10) : chlorure de sodium 22 g.; phosphate bicalcique hydraté 130 g.; citrate de potassium 125 g.; sulfate de magnésium 7 H_2O 30 g.; citrate ferrique 5 g.; "traces" 0,7 g. Les traces sont apportées par le mélange : iodure de potassium 12 g.; fluorure de sodium 10 g.; sulfate de manganèse anhydre 2 g.; iodure cuivreux 1 g.; alun de potassium anhydre 1 g. En outre, on ajoute à chaque kilo de régime : thiamine 10 mg , riboflavine 10 mg, pantothénate de calcium 40 mg, choline 500 mg, acide nicotinique 100 mg, acide para-amino benzoïque 600 mg, inositol 1 g., biotine 25 mg, vitamine K 20 mg, α - tocophénol 10 mg.

Les animaux du groupe 1 (animaux témoins) reçoivent en plus par jour chacun 15 μg de vitamine B_6 ajoutés au régime sous forme de 1 ml de solution aqueuse; les animaux du groupe 2 (animaux carencés) reçoivent de la même manière 1 ml d'eau.

Dans le cas des animaux carencés à qui, au bout d'un certain temps de carence, on a redonné de la vitamine B_6, cette dernière a été administrée par gavage, sous forme

de quelques gouttes d'une solution concentrée, en raison de la perte d'appétit que présente toujours l'animal carencé.

D - Etude des transaminations -

L'étude des transaminations a été faite dans les conditions qui ont été déterminées par F. Chatagner (3) : un volume total du milieu réactionnel de 12.5 ml contient 5 ml de suspension d'organe broyé, 5 ml de solution tampon phosphate M/15 p H 7.3, chlorure de magnésium 10-3 M, cystéinesulfinate ou cystéinesulfonate de sodium 10-2 M, α-cétoglutarate de sodium 10-2 M, et, dans certains cas, du sel de calcium de phosphate de pyridoxal (Merck), 25γ g. Le tout, sous azote, est maintenu à 35º pendant 2 heures.

Le dosage de SO_2 est effectué directement sur le milieu, en ajoutant à ce dernier 3 ml d'acide phosphorique et une goutte d'alcool octylique, l'anhydride sulfureux libéré est déplacé par un courant d'azote, cette élimination étant facilitée par le chauffage progressif de la cellule jusqu'à ébullition. Il est recueilli dans 20 ml d'une solution de soude 0,1 N. Le titrage à l'iode, après acidification du milieu par 2 ml d'acide chlorhydrique 2 N, est effectué en retour par une solution de thiosulfate N/20.

Le dosage de l'alanine et la caractérisation des acides aminés et des acides cétoniques sont faits sur le milieu enzymatique, déprotéinisé par 3 fois son volume d'alcool à 95º. Le liquide de centrifugation est concentré sous pression réduite à une température inférieure à 35º pour éliminer l'alcool.

Pour le dosage de l'alanine, la solution doit être préalablement passée sur des échangeurs d'ions (voir ci-dessous § G), pour éliminer l'acide cystéine-sulfinique qui interfère dans le dosage (3). Ce dernier est effectué selon la méthode d'Alexander et Seligman (11) qui transforme l'alanine en acétaldéhyde, par action de la ninhydrine à ébullition en tampon phosphate pH :5,5. L'acétaldéhyde est recueilli dans une solution refroidie de bisulfite de sodium. L'aldéhyde est ensuite libéré par l'acide sulfuri-

que et dosé par colorimétrie après réaction avec le parahydroxydiphényl. Les conditions suivantes ont été réalisées:

Alanine : 1 à 2 ml de solution contenant de 20 à 100 γ d'alanine,

ninhydrine : 1 ml de solution aqueuse à 1%,

tampon phosphate : 2 ml de solution 0,067 M pH : 5,5.

bisulfite de sodium : 8 ml de solution aqueuse à 1 %.

L'ébullition a lieu pendant 75 minutes. Puis le volume de la solution de bisulfite est amené à 10 ml. Le dosage est fait sur 0,2 à 1 ml de la solution, à laquelle on ajoute 1 goutte de sulfate de cuivre 4%, 6 ml d'acide sulfurique concentré en refroidissant, puis 2 gouttes de parahydroxydiphényl en solution à 1% dans la soude à 10%.Après 30 minutes à 37º on lit au photomètre (Pulfrich filtre S57) La caractérisation des acides aminés et des acides cétoniques formés au cours des transaminations sera décrite ci-dessous (voir § F - Chromatographie sur papier).

E - Etude des décarboxylations -

Les dégagements de CO_2 ont été suivis dans des cellules de Warburg à double fiole latérale, à 35º. L'atmosphère est en général de l'azote, sauf dans l'essai d'un tampon bicarbonate où elle est faite d'un mélange azote + 5 % de CO_2.

Le volume du liquide introduit dans la cellule varie de 3,2 à 3,6 ml selon les essais : le compartiment principal renferme :

- 2 ml de préparation enzymatique,
- un tampon constitué dans presque tous les cas par 0,8 ml de solutions 0,25 M de phosphate monopotassique et de phosphate disodique. Dans le cas du tampon bicarbonate, on utilise 0,2 ml d'une solution 0,I M de bicarbonate de sodium.

Une des fioles latérales contient 0,2 ml de la solution du substrat, neutralisée en présence d'une goutte d'indicateur universel par de la soude fraîchement préparée, la seconde fiole latérale renferme 0,2 ml d'une solution d'acide sulfurique 5 N, servant à libérer le CO_2 en fin d'expérience.

L'addition d'activateurs éventuels des décarboxylations est effectuée par introduction de 0,1 ml de solution de ces substances dans le compartiment principal, avant

l'addition des préparations de tissus.

Le passage des gaz destinés à changer l'atmosphère de la cellule a lieu pendant 7 minutes sous pression assez forte (dénivellation de 3 cm environ entre les liquides des 2 branches du manomètre). Puis, après une agitation de 1/4 d'heure dans le thermostat pour réaliser l'équilibre de température, le substrat est introduit dans le compartiment principal.

Dans le cas de l'utilisation de tampon phosphate, à la fin de l'expérience, l'acide sulfurique est ajouté pour libérer le CO_2 produit au cours des décarboxylations et retenu par les tampons et les protéines du milieu. D'autre part, nous avons évalué, à l'aide d'une solution connue de bicarbonate, la proportion de CO_2 dégagé avant acidification du milieu, selon le pH du tampon utilisé. Nous avons obtenu les résultats suivants :

pH	% de CO_2 dégagé
4,5	94
5,6	93
6,4	74
6,8	57
7,1	43
7,3	28
8,3	0

Dans les essais effectués, il n'y a pas eu mise en évidence de l'influence de la quantité totale de CO_2 à dégager sur la proportion de CO_2 libéré avant acidification. Ces essais nous ont autorisé à accepter comme valables, à un coefficient connu près, les chiffres obtenus au cours même de nos expériences.

L'analyse chromatographique sur papier du contenu des cellules de Warburg a été souvent réalisé. (voir ci-dessous § F). Pour cela, on transvase le contenu de la cellule dans un tube à essais. En présence d'une goutte d'indicateur universel, on neutralise le milieu, fortement acide par suite de l'addition de $SO_4 H_2$, par une solution saturée de baryte. On laisse floculer le précipité de sulfate de baryum pendant quelques minutes au bain-marie bouillant. Le précipité est ensuite filtré sur papier à la trompe et lavé à l'eau chaude - Le liquide est concentré sous pression réduite et amené à 1,5 ou 2 ml.

F - Chromatographie sur papier -

1) Chromatographie qualitative d'acides aminés -

La chromatographie sur papier a été réalisée dans les conditions suivantes :

- Papiers : Whatman nº 1 et Whatman nº 4
- Solvants : phénol - eau (80 : 20)
  butanol - acide formique - eau (75; 15 :10)
- Réactifs : ninhydrine, solution à 0,2% dans le butanol ou le butanol - acide acétique 1%
  : iodoplatinate (12) : 4 ml d'acide chloroplatinique 0,002 M,
  0,25 ml d'iodure de potassium 1 M,
  0,40 ml d'acide chlorhydrique 2 N
  dans 76 ml d'acétone.

Ce mélange est le réactif des acides aminés soufrés dont le soufre est lié à une fonction réductrice (d'autres substances non soufrées et réductrices, comme l'éthanolamine sont révélées également par l'iodoplatinate). Après évaporation du solvant, la feuille est plongée dans le réactif. Par simple séchage à l'air, on obtient des taches blanches sur fond rose.

Nous rappelons ici les Rf des principaux acides aminés présents dans nos solutions, Rf déjà signalés ou Rf observés au laboratoire.

Acide aminé	Phénol - Eau	Butanol - Acide formique - Eau
Ac. Cystéique	0,05	0,04
Ac. Cystéine-Sulfinique	0,12	0,08
Ac. Aspartique	0,12	0,16
Ac.Glutamique	0,23	0,27
Glycocolle	0,41	0,17
Taurine	0,40	0,07
Alanine	0,55	0,31
Hypotaurine	0,63	0,10

2) Chromatographe quantitative d'acides aminés -

Elle a été réalisée de la façon suivante, qui présente des modifications de détail par rapport à la technique utilisée par Awapara (13) : les solutions initiales d'acides aminés sont à des concentrations variant de 0.06 à 0.12 M. On applique 2,5 λ de ces solutions sur des feuilles de papier Whatman nº 1. Les chromatogrammes sont développés dans le phénol-eau et séchés à l'air à la température ordinaire pendant 24 heures. Ils sont révélés par une solution de ninhydrine à 0,05% dans le butanol saturé d'eau. Les emplacements correspondant aux acides aminés et des témoins de même surface, ne contenant aucun acide aminé et prélevés sur le même chromatogramme, sont découpés et introduits dans des tubes auxquels on ajoute 5 ml du réactif de Stein et Moore dilué (13). Après 30 minutes au bain-marie bouillant, les liquides sont dilués par 5 ml d'isopropanol 1/2. Les papiers sont retirés et les intensités des colorations déterminées au colorimètre (Pulfrich-filtre S 57). Les lectures correspondant aux acides aminés sont corrigées de la valeur obtenue avec des blancs de même surface, et reportées sur une courbe étalon faite dans des conditions analogues. Le rendement en acide aminé, évalué en comparant deux courbes étalon faites, l'une avant toute chromatographie, l'autre après développement dans le phénol, est de l'ordre de 90%, à la seule condition de ne jamais chauffer le chromatogramme quand il est imprégné de phénol : en observant cette précaution, on obtient en outre pour les blancs des coefficients d'extinction ne dépassant pas 0,20 pour des surfaces allant jusqu'à 10 cm2.

3) Chromatographie qualitative des acides cétoniques -

sous forme de 2 - 4 - Dinitrophénylhydrazones

Nous utilisons une méthode dérivée de celle de Cavallini : la technique de El Hawary et Thompson (14), qui consiste à transformer les acides cétoniques en 2.4. dinitrophénylhydrazones qui, purifiées, sont chromatographiées sur papier Whatman nº 3, dans le solvant : butanol - éthanol - ammoniaque N/2 (70 : 10:20).

Pour une fraction du liquide de déprotéinisation, contenant environ 1 μ mol d'acide cétonique, on utilise 2 ml d'une solution de 2.4 - dinitrophénylhydrazine à 0.1% dans l'acide chlorhydrique 2 N. On laisse 30 minutes à 38º. Au liquide, mis dans une ampoule à décantation, on ajoute 4 ml d'acétate d'éthyle. La couche aqueuse inférieure est soutirée et extraite à nouveau par 4 ml d'acétate d'éthyle. Les solutions d'acétate d'éthyle sont mélangées et extraites en 3 fois par 2 ml de carbonate de soude à 10%. Les solutions de carbonate sont réunies et extraites par 2 ml

d'acétate d'éthyle pour éliminer la 2.4 - dinitrophénylhydrazine en excès. Puis elles sont neutralisées lentement par de l'acide chlorhydrique 2 N froid jusqu'à pH : 4 - On ajoute de nouveau en 3 fois 2 ml d'acétate d'éthyle.Les 2.4. dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques passent, dans ces conditions de pH, dans l'acétate d'éthyle.

Les solutions d'acétate d'éthyle sont concentrées à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par 0,5 ml de soude N/10. Le liquide obtenu est rouge. Il vire au jaune par addition de quelques gouttes de tampon phosphates M/7.5 pH : 7,3 - Le volume de la solution est amené à 1 ml, et le liquide est chromatographié. Après évaporation du solvant, on observe sur le chromatogramme des taches jaunes au niveau des 2.4. dinitrophénylhydrazones.

Les Rf, obtenus par nous pour les 2.4. dinitrophénylhydrazones des acides pyruvique et α- cétoglutarique, sont les suivants :

Acide Pyruvique : trois taches Rf = 0,36 - 0,57 - 0,70

Acide α-cétoglutarique : une tache Rf = 0,15

La présence de plusieurs taches pour l'acide pyruvique a été signalée par différents auteurs (14,15) correspondant, au moins pour deux d'entre elles, aux formes cis et trans de la phénylhydrazone de cet acide.

- sous forme d'acides cétoniques libres

On chromatographie dans ce cas directement le liquide de déprotéinisation sur papier Whatman n° 1 dans le solvant : butanol - acide formique - eau (75 : 15:10);après évaporation du solvant à la température ordinaire, on pulvérise sur le chromatogramme une solution à 0,05% d'orthophénylénediamine dans l'acide trichloracétique à 10% (16). Après séchage, on met le chromatogramme au four à 100° pendant 2 minutes. Les acides cétoniques sont identifiés par des taches jaune-vert, fluorescentes en lumière ultra-violette (lampe Mineralight 3660 A°).

Les Rf, que nous avons obtenus pour l'acide pyruvique et pour l'acide α- cétoglutarique dans ces conditions sont les suivants :

Acide Pyruvique : trois taches Rf = 0,12 - 0,26 - 0,50

Acide α-cétoglutarique: une tache Rf = 0,37

G - Utilisation d'échangeurs d'ions pour la séparation de quelques acides aminés formés au cours de la dégradation enzymatique de l'acide cystéine sulfinique.

Les acides aminés qui peuvent se former au cours de la dégradation enzymatique de l'acide l-cystéine-sulfinique sont les suivants (14) :

Acide glutamique, alanine (transamination)
hypotaurine (décarboxylation)
Acide cystéique, taurine (oxydation)

L'analyse qualitative des mélanges est toujours faite par chromatographie sur papier (voir ci-dessus § E). L'analyse quantitative est effectuée, soit après isolement de chaque substance par dosage de l'azote aminé selon Van Slyke - Neill (17) (méthode qui s'applique également à la taurine et à la β alanine), soit par dosage spécifique dans le cas de l'alanine (voir ci-dessus § C).

Les échangeurs d'ions utilisés ici sont : l'alumine "acide", la permutite 50, l'amberlite IRA.400 après traitement par le bicarbonate ou par la soude. Si les propriétés adsorbantes de l'alumine "acide" vis-à-vis des acides aminés à étudier ont déjà été reconnues (3), le mode d'utilisation de la Permutite 50 et de l'Amberlite IRA 400 pour la séparation de ces substances a été mis au point au cours de notre travail.

1) Utilisation de l'alumine "acide"

L'alumine est préparée selon Wieland (18) et lavée selon les indications de Fromageot, Jutisz et Lederer (19). On sait que cet échangeur est susceptible de séparer quantitativement, d'une part les acides aminés basiques et neutres, qui ne sont pas retenus sur la colonne, et d'autre part les acides aminés acides qui sont adsorbés et peuvent être élués par la soude (19). L'acide cystéique et l'acide

cystéine - sulfinique se comportent ici, comme les acides aminés dicarboxyliques et se retrouvent par conséquent avec eux dans l'éluat. D'autre part, sur une telle colonne, l'hypotaurine et la taurine, se comportant comme les acides aminés neutres, passent quantitativement dans le filtrat (3).

Nous avons utilisé des colonnes de 1 cm de diamètre, constituées par 5 g. d'alumine "acide" : on fait passer sur la colonne adsorbante 3 ml de la solution à analyser contenant au maximum 10 mg d'acides aminés acides. On lave ensuite avec 50 ml d'eau distillée. La colonne est ensuite traitée par 15 ml d'une solution de Na OH 0,5 N, puis par 15 ml d'une solution de Na OH 0,10 N.

2) Utilisation de la Permutite 50

La Permutite 50 retient les cations minéraux et la plupart des acides aminés; ces derniers peuvent être élués sélectivement par l'ammoniaque normale ce qui permet de réaliser la déminéralisation des solutions d'acides aminés; cependant, la taurine non retenue sur cette résine passe intégralement dans le filtrat (20).

Les colonnes utilisées ici ont généralement 1 cm de diamètre intérieur et contiennent 5 g. de permutite (hauteur 10,5 cm). Les solutions étudiées sont, soit des solutions de l'un des acides aminés suivants : acide cystéique, acide cystéine-sulfinique, taurine, hypotaurine, alanine, glycocolle, acide aspartique, acide glutamique, soit des solutions d'un mélange de deux ou de plusieurs d'entre eux, soit des liquides de déprotéinisation de milieu enzymatique. Le volume de la solution à analyser est amené à environ 5 ml. Nous n'avons jamais dépassé 1% du poids de résine employée, soit ici 50 mg, comme quantité totale des acides aminés introduits. Après le passage de

la solution à analyser, la résine est lavée par 50 ml d'eau, et l'élution des acides aminés est effectuée le plus souvent par 50 ml d'ammoniaque normale. Toutefois, dans certaines expériences, l'agent éluant est constitué par 250 ml d'acide chlorhydrique N/500.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Qualitativement : La chromatographie sur papier montre que :
  - L'acide cystéique passe intégralement dans le filtrat,
  - L'acide cystéine-sulfinique passe également complètement dans le filtrat,
  - L'acide aspartique est retenu sur la résine; on le récupère par élution à l'ammoniaque normale.

Il faut faire ici deux remarques :

α - la différence de comportement entre l'acide cystéine-sulfinique et l'acide aspartique correspond vraisemblablement à ce que la dissociation du groupement sulfinique est supérieure à celle du groupement carboxylique. L'ionophorèse sur papier montre en effet que l'acide cystéine-sulfinique possède un point isolélectrique beaucoup plus bas que ceux des acides aminés dicarboxyliques ou de la taurine.

β - La rétention de l'acide aspartique sur la Permutite 50 est relativement faible. Pour que cette rétention soit totale dans les conditions réalisées, la quantité d'acide aspartique ne doit pas dépasser 25 mg.

L'hypotaurine est retenue sur la Permutite 50; on la récupère par élution à l'ammoniaque normale; elle se trouve ainsi dans l'éluat avec les autres acides aminés : dicarboxyliques, neutres et basiques.

Ici aussi, il convient de faire les remarques suivantes :

α - la rétention de l'hypotaurine sur la Permutite est encore plus faible que celle de l'acide aspartique; pour obtenir une adsorption complète, dans les conditions actuelles, la quantité d'hypotaurine ne doit pas dépasser 10 mg.

β - si, au lieu d'éluer par l'ammoniaque normale, on effectue l'élution par une solution très diluée d'acide chlorhydrique (N/500), l'hypotaurine, à l'exclusion de tout autre acide aminé, y compris les acides aminés dicarboxyliques, se détache lentement de la résine. Il faut un relativement grand volume d'acide chlorhydrique dilué pour éluer ainsi l'hypotaurine; et ce volume est environ de 250 ml pour une colonne de 5 g. de Permutite, l'hypotaurine n'étant présente que dans les 150 derniers ml. On sait que ni l'hypotaurine, ni la taurine ne sont adsorbées sur alumine acide : vis-à-vis de cet adsorbant, elles ne se différencient donc pas des acides aminés neutres. Il apparait au contraire que, vis-à-vis de la Permutite, elles se comportent comme plus acides que les acides aminés dicarboxyliques; ce comportement pourrait correspondre à une influence s'exerçant différemment selon les divers adsorbants, non seulement de la dissociation des groupes acides, mais aussi de leur nombre.

- Quantitativement - le Tableau I, qui précise les conditions expérimentales réalisées, montre que la proportion de récupération des acides aminés après passage sur Permutite 50 d'un mélange synthétique comprenant de l'acide cystéine-sulfinique, de l'acide glutamique et de l'alanine est très satisfaisante.

TABLEAU I

Degré de récupération des acides aminés après passage sur Permutite 50 (5 g.)

5 ml de solution à analyser; élution par 50 ml N H_4OH N

Nature de l'acide aminé	Filtrat	Eluat	µ mol initiales	µ mol retrouvées	% récupération
Acide cystéine-sulfinique	+	0	46.8	45.2	96.5
Alanine	0	+	112.4	112.4	100.0
Acide glutamique	0	+	75.2	71.6	95.2

La Permutite 50 permet ainsi de séparer quantitativement les acides aminés qui nous intéressent en deux groupes :

filtrat : acide cystéine, acide cystéine-sulfinique, taurine,

éluat : hypotaurine, acides aminés dicarboxyliques, alanine.

3) Utilisation de l'Amberlite IRA-400

a - Après traitement à la soude 4% - A cause de sa carbonatation rapide, l'amberlite IRA-400 doit être lavée immédiatement avant usage successivement par H Cl 2N, eau distillée, soude 4% exempte de CO_2 (21) et eau exempte de CO_2. Une telle résine adsorbe alors énergiquement les anions et la plupart des acides aminés sauf l'arginine. Cette résine est utilisée ici sous forme d'une colonne de 1 cm de diamètre contenant 5 g. de résine (hauteur = 14,5 cm)les solutions étudiées contiennent les mêmes acides aminés qui ont été mentionnés à propos de la Permutite,

mais à une concentration très inférieure : 5 ml d'une solution contenant 1 mg de chacun des acides aminés sont versés sur la colonne, puis celle-ci est lavée par 50 ml d'eau. L'élution est faite successivement par des solutions d'acide acétique N/10, N et 2 N, puis par une solution d'acide chlorhydrique N/10, en utilisant chaque fois 50 ml de solution, les résultats obtenus sont les suivants :

- Qualitativement - la chromatographie sur papier montre que :

L'alanine, l'hypotaurine et la taurine sont libérées seules par l'acide acétique N/10 - L'utilisation d'acide acétique à des concentrations inférieures à N/10 ne permet pas de séparer ces trois constituants.

L'acide aspartique seul est élué par l'acide acétique normal.

L'acide cystéine-sulfinique seul est élué par l'acide acétique 2 N.

L'acide cystéique qui est le plus énergiquement fixé sur la résine est élué par l'acide chlorhydrique N/10.

- Quantitativement : le Tableau II, qui précise les conditions expérimentales réalisées, montre que la méthode permet de séparer l'acide cystéine-sulfinique de l'acide cystéique. Malheureusement, le degré de récupération des acides aminés après passage sur Amberlite IRA 400 ne dépasse pas en général 80 %, sauf pour l'acide cystéique.

TABLEAU II

Degré de récupération des acides aminés après passage sur Amberlite IRA 400 traitée par la soude -

5g de résine; 5 ml de solution contenant 1 mg de chaque acide aminé; 50 ml de chaque agent éluant.

Agent éluant	Acide aminé élué	µ mol initiales	µ mol retrouvées	% récupération
Ac.acétique N/10 Ac.Acétique N	Alanine Taurine Ac.Aspartique	26,7	21,9	82
Ac. Acétique 2N	Ac.Cystéine Sulfinique	6,5	5,1	78
Ac.Chlorhydrique N/10	Ac. Cystéique	5,9	5,8	99

b - Après traitement par une solution saturée de bicarbonate de sodium (technique de Piez (22).

On agite pendant 2 heures et à la température ordinaire la résine préalablement traitée par la soude (voir précédemment) avec une solution saturée de bicarbonate de sodium; on la lave ensuite avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. La résine se trouve alors saturée en ions CO_3H qu'elle est capable d'échanger contre des anions plus forts en libérant CO_2. Elle ne fixe pas la plupart des acides aminés. Cette résine permet donc la désacidification d'une solution d'acides aminés.

Le dégagement du CO_2 au cours des échanges ne permet pas d'utiliser sous forme de colonne l'Amberlite ainsi traitée. Cette résine est introduite directement dans les solutions à désacidifier où elle est agitée pendant 30 minutes. Elle est ensuite recueillie

par décantation, puis lavée plusieurs fois à l'eau distillée.

Les expériences sont faites dans les conditions suivantes :

a - Acide glutamique : 20 mg d'acide glutamique sont dissous dans 25 ml d'eau. On ajoute à cette solution 2 g. d'Amberlite; la résine est ensuite lavée trois fois, chaque fois par 10 ml d'eau, on constate alors que l'acide glutamique est entièrement retenu par la résine.

b - Acide cystéine-sulfinique, acide cystéique, taurine.

2 mg de chacun de ces acides aminés sont dissous dans 7 ml d'eau. On ajoute à cette solution 500 mg d'Amberlite; la résine est lavée ensuite 3 fois, chaque fois par 8 ml d'eau. La chromatographie sur papier et des dosages d'azote aminé montrent que, dans ces conditions l'acide cystéine-sulfinique et l'acide cystéique sont adsorbés sur la résine, alors que 1/3 de la taurine est adsorbé et les 2/3 passent dans le filtrat.

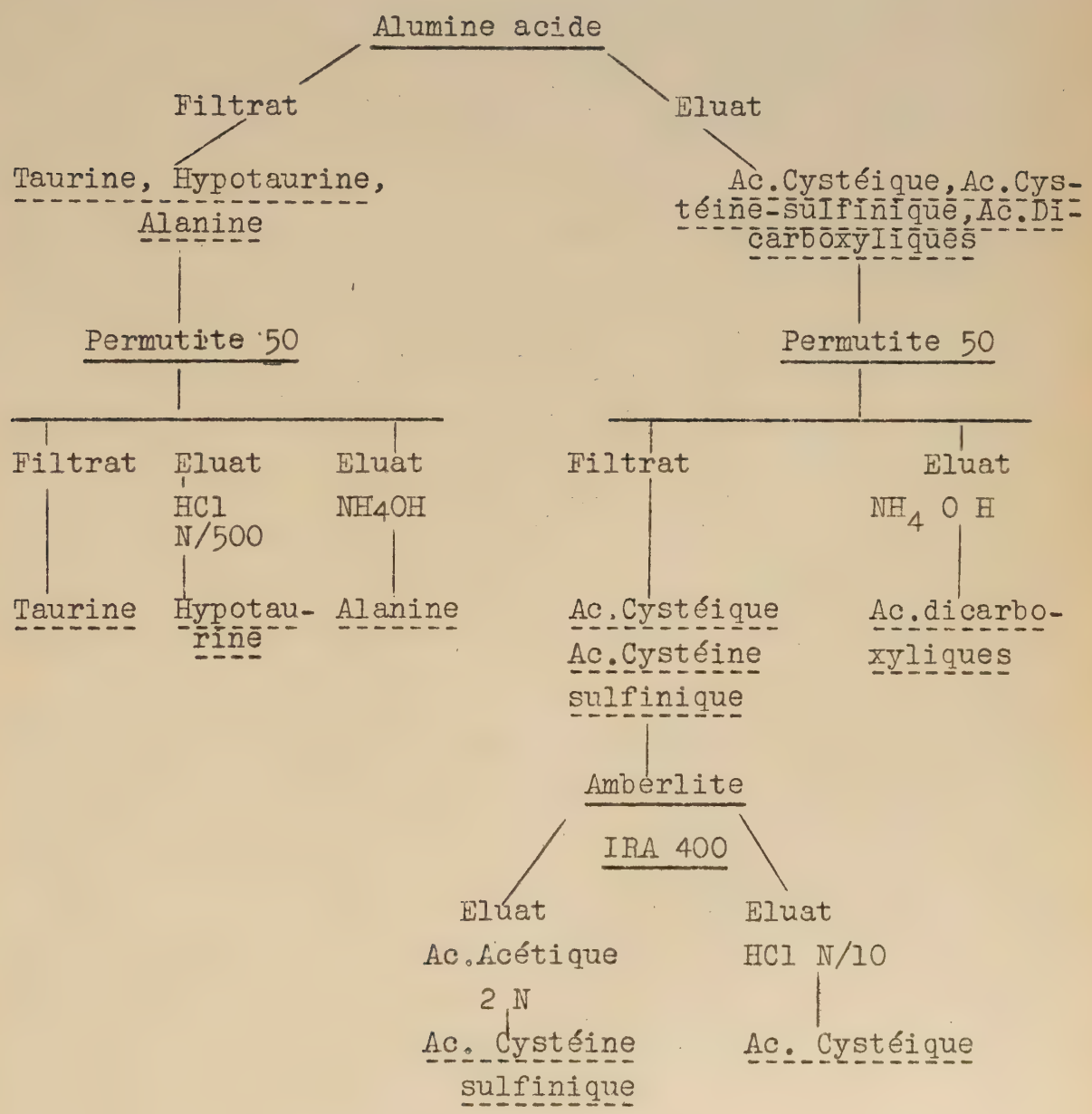
c - L'hypotaurine et l'alanine ne sont pas retenues sur la résine.

Il apparaît ainsi que l'Amberlite IRA 400 après traitement par la soude puis par le bicarbonate n'adsorbe pas les acides aminés neutres et l'hypotaurine, ne fixe la taurine que faiblement, mais retient énergiquement les acides aminés dicarboxyliques, l'acide cystéine-sulfinique et l'acide cystéique. L'Amberlite sous cette forme ne peut donc pas être utilisée pour désacidifier des solutions autres que celles d'acides aminés monobasiques.

L'ensemble des résultats précédents permettant de réaliser la séparation des acides aminés en question ici, peut être résumé par le schéma I.

Schéma I

Séparation des acides aminés résultant du métabolisme de l'acide L - cystéine-sulfinique



CHAPITRE I

MISE EN EVIDENCE DE L'ACIDE CYSTEINESULFINIQUE DANS LE CERVEAU DU RAT NORMAL.

Parmi les acides aminés et substances voisines des acides aminées reconnues par Awapara dans le cerveau du rat (23), les constituants soufrés sont représentés principalement par la taurine, (300 γ environ par gramme de tissu frais) et par le glutathion et la méthionine qui existent seulement en très faibles quantités.

Au cours des expériences de décarboxylations que nous avons effectuées sur des suspensions de cerveau de rat normal (voir plus loin Chapitre III), de nombreux chromatogrammes sur papier ont été faits à partir des milieux enzymatiques, et notamment à partir des "témoins", c'est-à-dire des suspensions de cerveaux, placés une ou deux heures à 35º sous agitation, en tampon phosphates M/15 pH : 6.8 et ne contenant pas de substrat ajouté (voir Techniques § E et F). Nous retrouvons, après révélation à la ninhydrine, les acides aminés les plus importants indiqués par Awapara.

Dans ces conditions, nous constatons que les chromatogrammes, développés dans le phénol, révélés par la ninhydrine et par l'iodoplatinate, indiquent souvent en outre la présence d'une substance S, aminée et réductrice, donc très probablement soufrée, située au niveau de l'acide aspartique (Rf = 0.13), comme le représente le schéma 2 (nºII). Dans le butanol-acide formique-eau, la substance réagissant à l'iodoplatinate se situe au Rf = 0.07. Ces Rf correspondent à ceux de l'acide cystéinesulfinique dans ces mêmes solvants.

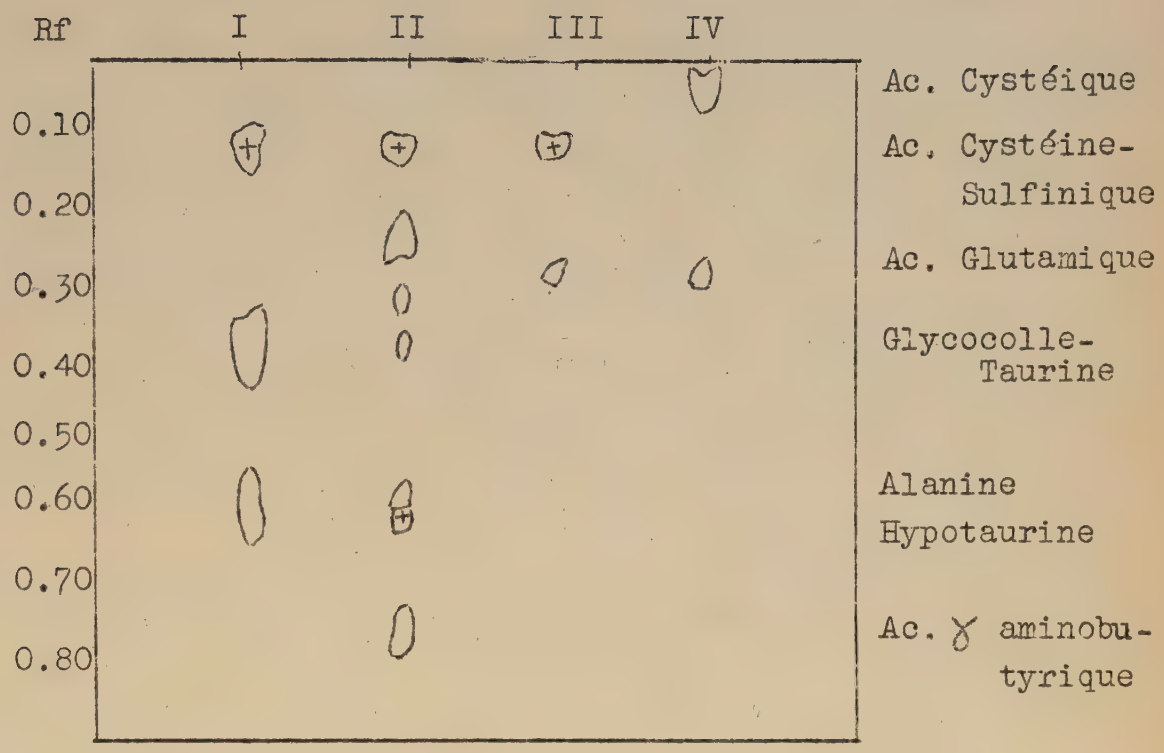


Schéma 2

Mise en évidence de l'acide cystéine-sulfinique dans le cerveau de rat.

Papier : Whatman 1 - Solvant : Phénol-Eau (80 : 20)

I - Mélange synthétique comprenant :
Acide Cystéine-sulfinique - Glycocolle - Alanine

II - Liquide déprotéinisé L provenant d'une suspension de cerveau de rat.

III - filtrat de Permutite 50 du liquide L.

IV - filtrat de Permutite 50 du liquide L, oxydé par l'acide performique.

Les taches, révélables à la fois par la ninhydrine et par l'iodoplatinate sont marquées d'une croix.

On sait que peu d'acides aminés, et seulement ceux qui possèdent au moins un groupement acide plus fort que le groupement carboxylique (acide cystéique-taurine-acide cystéinesulfinique), ne sont pas adsorbés sur la Permutite 50 (voir Techniques § G). Parmi les acides aminés soufrés réducteurs, l'acide cystéinesulfinique est le seul jusqu'à présent connu qui ne soit pas retenu.

Le liquide de déprotéinisation provenant des suspensions de cerveaux est donc versé sur une colonne de Permutite 50. On constate que la substance en question passe dans le filtrat (schéma 2 nº III).

Une partie du filtrat est alors oxydée par l'acide performique (24) : les analyses chromatographiques de la solution obtenue montrent que la substance S a disparu, et qu'il existe dans la solution oxydée, d'une part, en quantité importante, une substance S_1 aminée non réductrice,et dont les Rf sont de 0,04 aussi bien dans le phénol-eau (schéma 2 nº IV) que dans le butanol-acide-formique-eau; ces Rf correspondent à ceux de l'acide cystéique; et d'autre part, en faible quantité, une substance S_2 aminée et non réductrice possédant un Rf de 0,30 dans le phénol-eau et de 0,14 dans le butanol-acide formique-eau, et qui n'a pas été identifiée.

Il apparaît ainsi que, normalement, le cerveau du rat contient de l'acide cystéinesulfinique. Toutefois, il convient de remarquer que la présence de cet acide n'est pas absolument constante ; parfois il manque totalement,et, lorsqu'il est présent, sa quantité, déterminée approximativement par chromatographie sur papier, varie fortement d'une préparation à une autre (maximum : 1 mg pour 200 mg de substance sèche).

Il convient d'indiquer que, en même temps que l'acide cystéinesulfinique, on trouve, dans le cerveau, une très

faible quantité d'hypotaurine caractérisée par son comportement au cours des analyses chromatographiques (Rf = 0,63 dans le phénol-eau, révélée par la ninhydrine et par l'iodoplatinate). On sait que, contrairement à l'acide cystéine-sulfinique, l'hypotaurine est retenue sur Permutite 50 (voir Techniques § G).

Il est assez intéressant de constater que l'acide cystéinesulfinique parait exister dans le cerveau du rat en équilibre avec son produit de décarboxylation : l'hypotaurine, de la même manière que l'acide glutamique est en équilibre avec son produit de décarboxylation : l'acide γ aminobutyrique. La quantité de l'acide aminé devant être décarboxylé est dans les deux cas nettement supérieure à la quantité de l'acide aminé produit par la décarboxylation, ce qui peut expliquer que nous ayons réussi dans le cerveau à caractériser l'acide cystéine-sulfinique qui, dans d'autres organes, n'existe pas ainsi en équilibre avec ses produits de dégradation.

CHAPITRE II

ISOLEMENT DE L'HYPOTAURINE

(acide 2 - Aminoéthanesulfinique).

La structure de l'hypotaurine est admise depuis que cette substance a été caractérisée dans les préparations d'organe par chromatographie sur papier et que certaines de ses propriétés ont été reconnues ( ): acide aminé soufré réducteur, se comportant sur les échangeurs d'anionsde façon analogue aux acides aminés neutres, et surtout résultant de la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique, il devait en toutes probabilités posséder la formule ressortant de l'équation même de la décarboxylation

acide cysteinesulfinique. hypotaurine

Il était néanmoins nécessaire, puisqu'on se trouvait en présence d'un nouvel acide aminé soufré, d'isoler l'hypotaurine en quantité suffisante afin de pouvoir en établir définitivement la composition.

Les premières études sur la décarboxylation de l'acide L-cysteinesulfinique ont été faites chez le lapin. C'est à partir du foie de cet animal, dans les conditions optima qui ont été étudiées (3), que nous avons isolé l'hypotaurine.

1 - Milieu enzymatique de formation de l'hypotaurine.

Le milieu réactionnel est constitué par le mélange de

- 190 ml de suspension de broyat de foie de lapin, correspondant à 95 ml de foie de lapin et 95 ml d'eau distillée. Cette suspension est dialysée dans les conditions habituelles.
- 190 ml de solution tampon de phosphates M/15 pH 6,8

- 1 ml d'une solution contenant 100 µg du sel de calcium de phosphate de pyridoxal.
- 2 mg de thiamine.
- 5 ml d'une solution de cysteinesulfinate de sodium contenant 760 mg d'acide L-cysteinesulfinique.

L'ensemble est maintenu sous azote à 35º, pendant 5 heures.

2 - Déprotéinisation et analyse du milieu.

Après 5 heures, la réaction est arrêtée en plaçant le mélange pendant 8 minutes au bain-marie bouillant; on refroidit, on centrifuge et on lave une ou deux fois à l'eau distillée le culot de protéines précipitées. On obtient ainsi environ 300 ml d'un liquide coloré; on en prélève quelques gouttes pour une analyse par chromatographie sur papier (Schéma 3, nº 1); en même temps, on effectue une analyse chromatographique parallèle d'un milieu préparé de manière analogue, mais dans lequel on n'a pas introduit d'acide cystéinesulfinique (Schéma 3 nº II) - Les chromatographies montrent qu'il existe dans la préparation enzymatique toute une série d'acides aminés; après 5 heures, il reste encore une quantité notable d'acide cystéinesulfinique, et il est apparu de l'hypotaurine. On dose approximativement cette dernière par chromatographie quantitative sur papier, en établissant une courbe de référence à l'aide de β -alanine, dont le Rf dans le phénol est très voisin de celui de l'hypotaurine et qui, de structure très proche de celle de l'hypotaurine, est supposée réagir à la ninhydrine à peu près comme l'hypotaurine. Il convient ici d'autre part de laisser le solvant s'écouler suffisamment hors du papier pour obtenir une bonne séparation entre l'alanine et l'hypotaurine. On constate alors qu'il s'est formé au cours de l'action enzymatique environ 150 mg d'hypotaurine.

3 - Dialyse du liquide déprotéinisé. Passage sur Permutite 50 et élution par HCL N/500.

Le liquide déprotéinisé, additionné de quelques

gouttes d'alcool octylique pour empêcher la formation de mousses, est concentré à 30 ml environ, cette concentration ayant lieu à pression réduite et à une température ne dépassant pas 40º, sous atmosphère d'azote, afin d'éviter toute oxydation. Le liquide obtenu est dialysé à 4º pendant 20 heures contre 4 fois 400 ml d'eau distillée. Le liquide extérieur de dialyse est concentré dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à 125 ml (L_1).

L_1 est alors chromatographié sur Permutite 50 : on utilise deux colonnes constituées par 50 g de résine; on fait passer sur chaque colonne,

- la moitié de L_1
- 500 ml d'eau distillée

L'élution est effectuée par une solution d'acide chlorhydrique N/500; on recueille l'éluat par fractions de 600 ml pour les deux colonnes, et la présence d'hypotaurine est détectée par des touches sur papier (spot-tests) révélées à l'iodoplatinate. Les deux premières fractions ne contiennent pas d'hypotaurine; celle-ci apparait dans la troisième, passe par un maximum dans la quatrième et la cinquième et subsiste jusque dans la septième.

Les fractions éluées contenant l'hypotaurine sont réunies.

4 - <u>Désacidification de l'éluat HCL N/500 par l'Amberlite IRA-400 traitée par le bicarbonate</u>.

L'éluat de Permutite contenant l'hypotaurine doit être désacidifié avant d'être concentré, pour prévenir toute éventualité de dégradation de cet acide aminé en milieu trop fortement acide. Le liquide est désacidifié par addition, en agitant, d'Amberlite IRA-400 traitée par le bicarbonate, en quantité suffisante (environ 25g) pour neutraliser le milieu; on décante et on filtre la résine qui est lavée avec de l'eau distillée : on ajoute les eaux de lavage au liquide obtenu. Celui-ci est alors concentré à 50 ml,

dans les conditions indiquées plus haut. Une chromatographie qualitative sur papier montre que la solution ne contient pas d'acides aminés autres que l'hypotaurine (à l'exception d'une faible quantité de taurine résultant d'une oxydation de l'hypotaurine au cours des manipulations) (schéma 3, nº III). Un dosage par chromatographie quantitative indique que cette solution contient environ 140 mg d'hypotaurine.

5 - Second passage sur Permutite 50 de la solution d'hypotaurine. Elution à l'ammoniaque N. Décoloration par charbon H_2S.

Pour obtenir l'hypotaurine libre et à l'état aussi pur que possible, la solution précédente est passée par moitié, chaque moitié parallèlement sur une colonne de 35g de Permutite; les deux colonnes sont traitées chacune par 300 ml d'ammoniaque N. Les éluats sont recueillis par fractions de 50 ml. L'hypotaurine sort de la colonne en même temps que l'ammoniaque dans la quatrième fraction (caractérisation toujours par spot-test à l'iodoplatinate); celle-ci est rapidement évaporée sous pression réduite jusqu'à siccité; on reprend le résidu par quelques ml d'eau et on évapore de nouveau à sec. On élimine ainsi tout l'ammoniac et l'hypotaurine reste sous forme libre. Le résidu sec, légèrement jaunâtre, est repris par quelques ml d'eau distillée.

On ajoute alors à la solution un peu de charbon (acticarbone CECA S2). Ce charbon a été préalablement activé par l'acide chlorhydrique (10 g de charbon, traités en 2 fois par 200^{ml} HCl 2N pendant 30 minutes sous agitation, puis lavés à l'eau distillée jusqu'à pH = 5), puis lavé avec de l'eau saturée de H_2 S (19). Un tel traitement est indispensable pour éviter toute oxydation de l'hypotaurine en taurine au contact du charbon. Le contact de la solution avec le charbon ne dure que quelques minutes; le charbon est ensuite filtré et lavé avec de l'eau saturée de H_2 S.

Le filtrat est rapidement évaporé sous pression réduite, puis séché sous vide poussé en présence de potasse.

On obtient ainsi finalement 98 mg d'une poudre blanche très hygroscopique. Cette hygroscopicité rend son analyse difficile. Néanmoins, l'analyse élémentaire donne les résultats suivants :

Calculé pour	C	H	N	S
$C_2 H_7 O_2 NS$ = 109	22,01	6,46	12,83	29,35
trouvé	21,30	6,48	12,6	29,1

Le produit obtenu est très soluble dans l'eau et assez soluble dans l'alcool et l'acétone. Ses sels de zinc et de baryum sont également hygroscopiques et difficilement précipitables par les solvants organiques.

On peut titrer l'hypotaurine par le permanganate de sodium de la même manière que l'acide cystéinesulfinique (25)

Récemment, alors que nous étions nous-mêmes déjà en possession de l'hypotaurine isolée, deux auteurs ont réussi à réaliser la synthèse du produit : la première méthode, utilisée par Awapara (26), consiste à préparer le chlorure d'acide de la benzoyltaurine (à l'aide du chlorure de thionyle), à réduire ce dernier par le sulfite de sodium, et à hydrolyser par de l'acide chlorhydrique 6N. On obtient alors le chlorhydrate de l'acide 2-aminoéthanesulfinique (hypotaurine).
La seconde méthode, utilisée par Cavallini (7), est une transposition de la méthode de Lavine (9), appliquée à la cystamine : on synthétise d'abord le cystamine disulfoxyde par oxydation de la cystamine par l'acide perbenzoïque. Le cystamine disulfoxyde subit ensuite une dismutation en milieu ammoniacal, qui crée l'hypotaurine.

Il est assez curieux de constater que, dans notre cas comme dans celui des deux auteurs cités, l'hypotaurine n'a

pu être obtenue sous forme cristallisée.

De toutes façons, le produit isolé du milieu biologique et le produit obtenu par voie de synthèse présentent les mêmes propriétés, en particulier en ce qui concerne son Rf dans les différents solvants de chromatographie sur papier, sa révélation à l'aide des réactifs spécifiques et son oxydation en taurine.

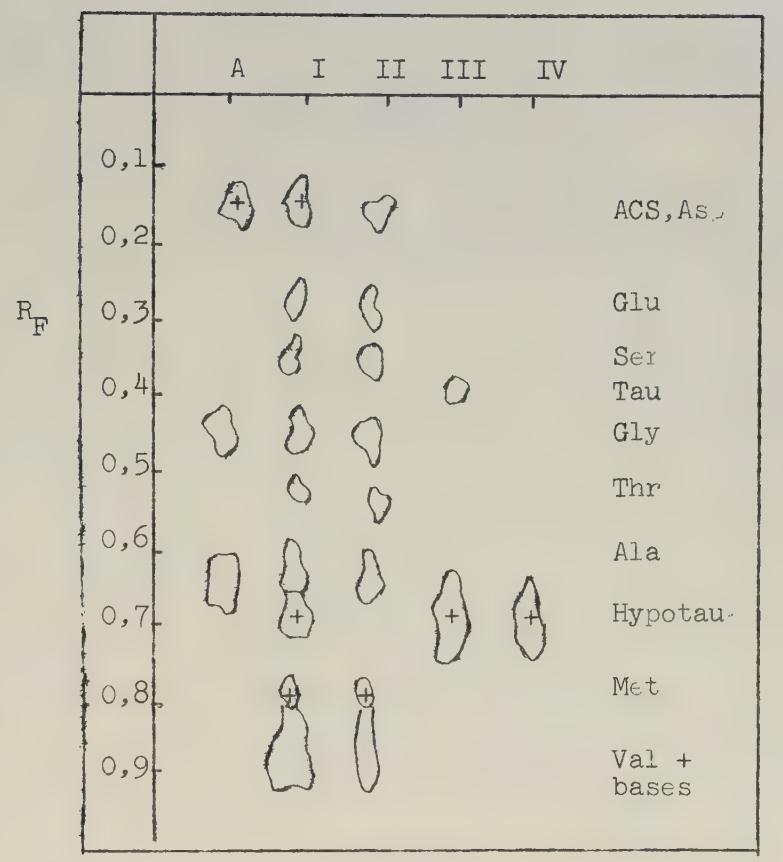


Schéma 3

Schéma des chromatogrammes obtenus aux différents stades de l'isolement de l'hypotaurine. Whatman I, phénol-eau (80 : 20).

A - Mélange synthétique comprenant : acide cystéinesulfinique (ACS), glycocolle, alanine.

I - Liquide déprotéinisé;

II - Liquide témoin déprotéinisé;

III - Eluat par HCl N/500 de permutite 50;

IV - Solutiond'hypotaurine obtenue après second passage sur permutite 50.

Les taches révélables à la fois par la ninhydrine et par l'iodoplatinate sont marquées d'une croix.

CHAPITRE III

ETUDE MANOMETRIQUE DE LA DECARBOXYLATION DE L'ACIDE L-CYSTEINESULFINIQUE
ROLE DU PHOSPHATE DE PYRIDOXAL
COMPARAISON DES DECARBOXYLATIONS DE L'ACIDE L-GLUTAMIQUE, DE L'ACIDE L-CYSTEINESULFINIQUE ET DE L'ACIDE L-CYSTEIQUE

L'hypotaurine est formée par la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéinesulfinique; cette décarboxylation est physiologiquement importante, comme il a été montré par F. Chatagner qui, à la suite d'expériences faites avec des préparations d'organes, a opéré in vivo au moyen d'injections intraveineuses d'acide cystéinesulfinique à des rats (3).

Les données actuelles que nous possédons d'autre part sur la formation de l'hypotaurine, et que nous avons déjà indiquées (5, 6, 7, 8) permettent d'affirmer que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est réellement, à côté de la décarboxylation de l'acide cystéique, une nouvelle voie importante de la formation de taurine dans l'organisme.

Les décarboxylations des acides aminés sont en général sous la dépendance du phosphate de pyridoxal. Tant pour l'acide cystéique que pour l'acide cystéinesulfinique, cette dépendance a déjà été étudiée, par l'analyse de l'urine et du foie de rats carencés en vitamine B_6. En même temps, Blaschko (27) et Tabéchian (8) ont remarqué que la carence provoque la disparition de la taurine de l'urine. Blaschko constate également la disparition de la décarboxylase de l'acide cystéique dans le foie. Tabéchian observe en outre que l'urine ne renferme plus d'hypotaurine et que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique par les préparations de foie est supprimée.

Nous rendons compte ici des résultats d'une étude plus complète de la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique

dans les organes du lapin et du rat. Nous étudions d'abord les conditions de fonctionnement de la décarboxylase, puis la répartition du système décarboxylant dans les différents organes.

L'action du phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique est mise en évidence sur les suspensicns d'organes provenant d'animaux normaux (lapin et rat). La répercussion d'une carence en vitamine B_6 sur la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique dans plusieurs organes du rat est étudiée. Des différences de comportement des divers tissus carencés au point de vue de leur réactivation par le phosphate de pyridoxal sont notées.

Enfin, l'étude de la comparaison des décarboxylations des trois acides aminés : acide glutamique, acide cystéinesulfinique et acide cystéique est entreprise dans plusieurs organes du rat et du lapin. L'accent est mis surtout sur la comparaison des deux décarboxylations de l'acide cystéinesulfinique et de l'acide cystéique, cette comparaison étant importante pour la reconnaissance de l'équilibre entre les deux modes possibles de formation de la taurine dans l'organisme.

I - Etude de la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique.

A - Conditions optima de fonctionnement de la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique.

La figure I représente les courbes obtenues dans la détermination du pH optimum de fonctionnement de la décarboxylase. Ce pH est situé aux environs de 6,8 - 6,9 quels que soient l'organe ou l'animal étudié.

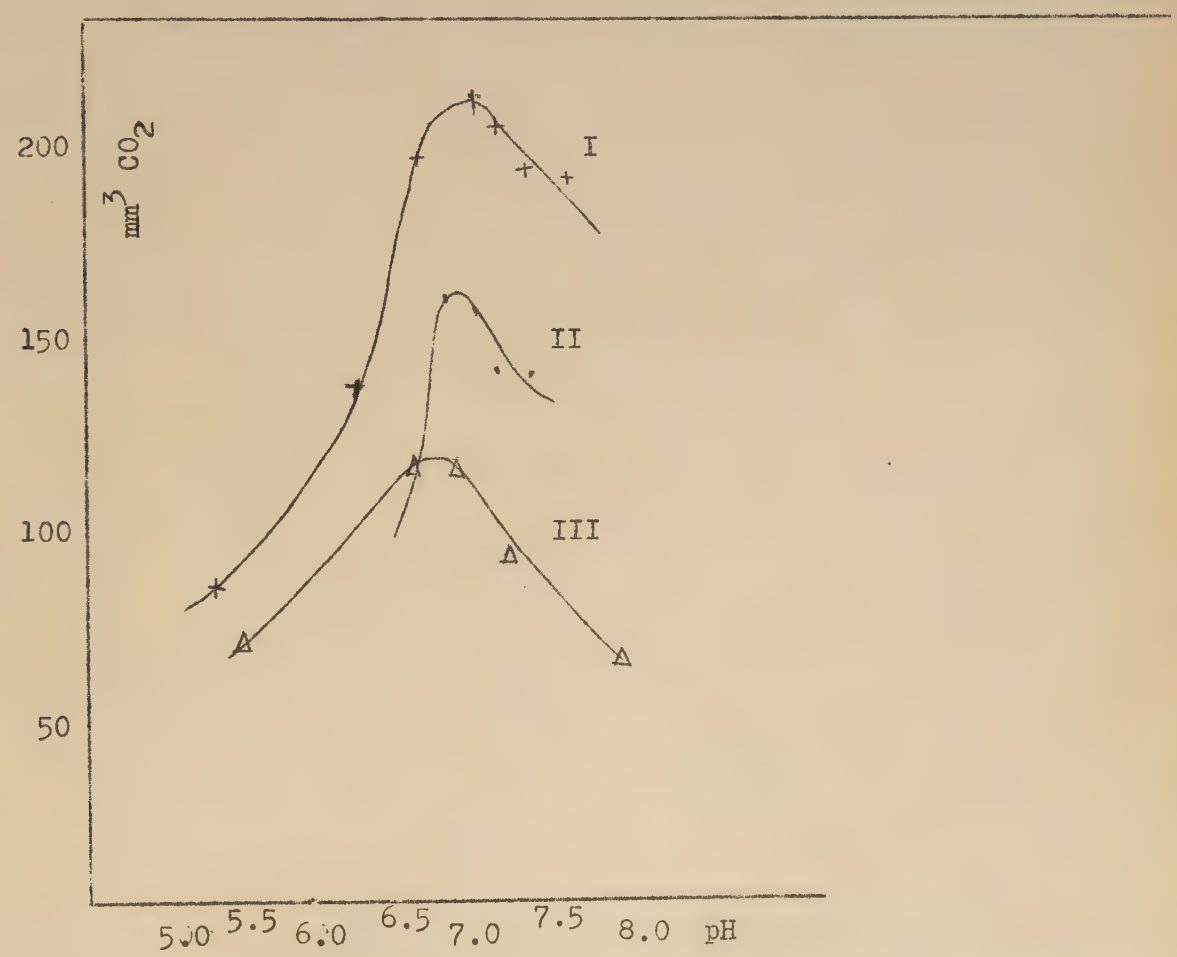


Fig. 1 : Détermination du pH optimum de la décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique.

I - Foie de rat (220 mg - 60 minutes)
II - Cerveau de lapin (500 mg - 200 γ phosphate de pyridoxal - 60 minutes)
III- Foie de lapin (1200 mg - 60 minutes)

2 ml d'homogénat - 0,8 ml tampon phosphates 0,25 M
Acide Cystéine-sulfinique 10^{-2} M.

La figure 2 représente les courbes obtenues à partir d'un même extrait, dont une partie a été mise en tampon phosphate et l'autre en tampon bicarbonate. La décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est nettement accélérée par le tampon phosphate, ce qui nous a amené à utiliser ce tampon dans nos expériences, malgré les difficultés qui résultent de leur emploi et qui sont dues à la rétention de CO_2 dans les pH neutres et alcalins (voir Techniques § E)

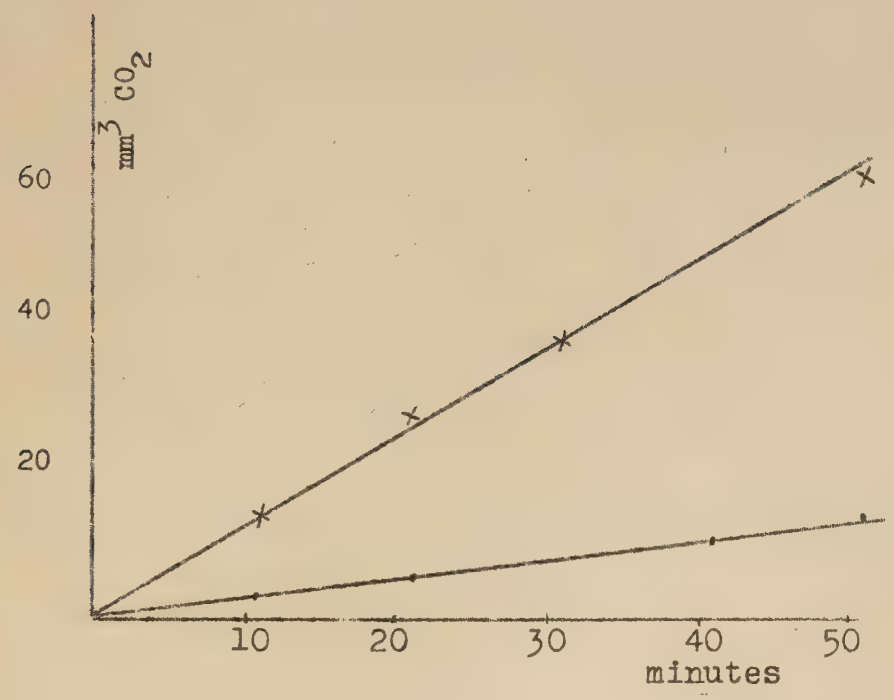


Fig. 2 : Décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique

tampon bicarbonate 0,1 M pH = 6,8
tampon phosphate 0,25 M pH = 6,8
2 ml d'extrait dialysé de poudre acétonique (200 mg) de foie de lapin.
Acide Cystéinesulfinique : 10^{-2} M.

La figure 3 représente les dégagements de CO_2 obtenus en fonction de la concentration en substrat dans le foie du lapin. Une courbe semblable est retrouvée dans l'étude du rein du lapin. Pour les deux organes, la constante de Michaelis est environ de 0,0015 M; pour des concentrations supérieures à 0,012 M, la vitesse de décarboxylation est très sensiblement diminuée.

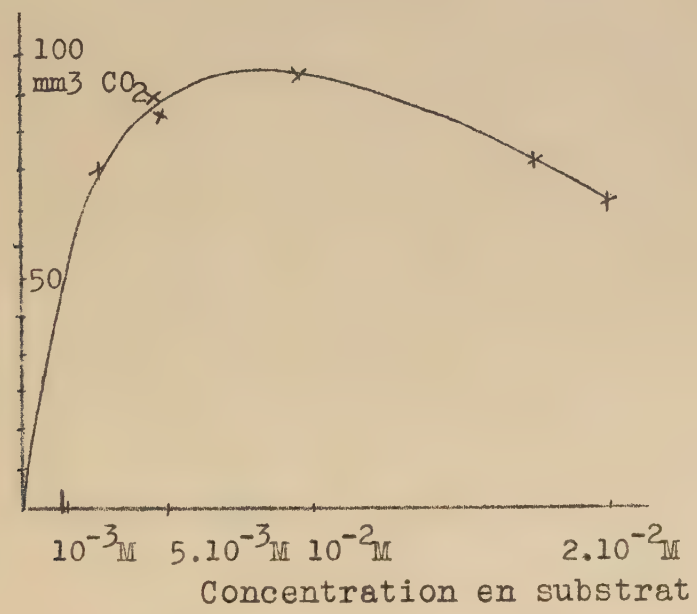


Fig. 3 : Influence de la concentration en substrat sur la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique, dans le foie du lapin.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais : 1000 mg)
0,8 ml tampon phosphate M/~~15~~ 4 pH : 6,8.

Nous n'avons pas déterminé la constante de Michaelis, qui est extrêmement faible, pour le foie du rat. Cet organe présente une activité considérable de décarboxylation par rapport aux autres organes étudiés, comme le montre la figure 4 et le tableau 4.

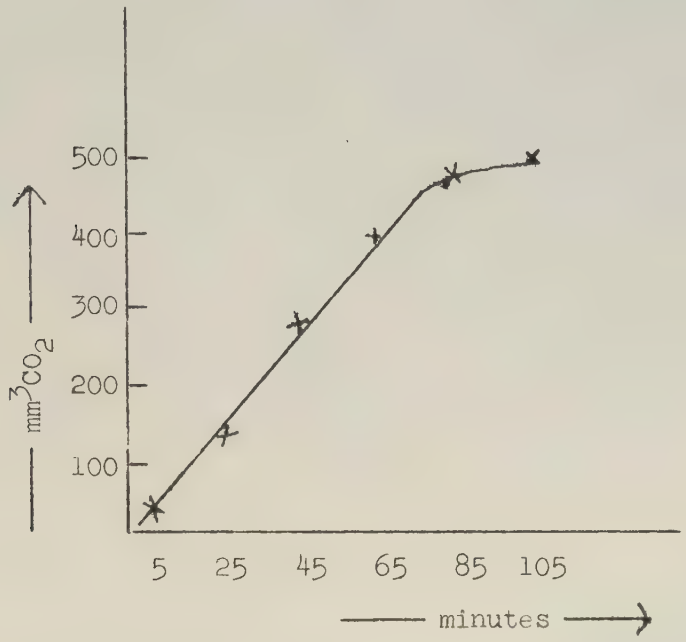


Fig. 4 : Décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique (A.C.S.) dans le foie du rat.

2 ml homogénat (poids d'organe frais : 280 mg)

0,8 ml tampon phosphates 0,25 M pH : 6,8

0,2 ml Acide Cystéinesulfinique 10^{-2} M.

Les figures 5 et 6 montrent l'influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale de la décarboxylation dans le foie du rat.

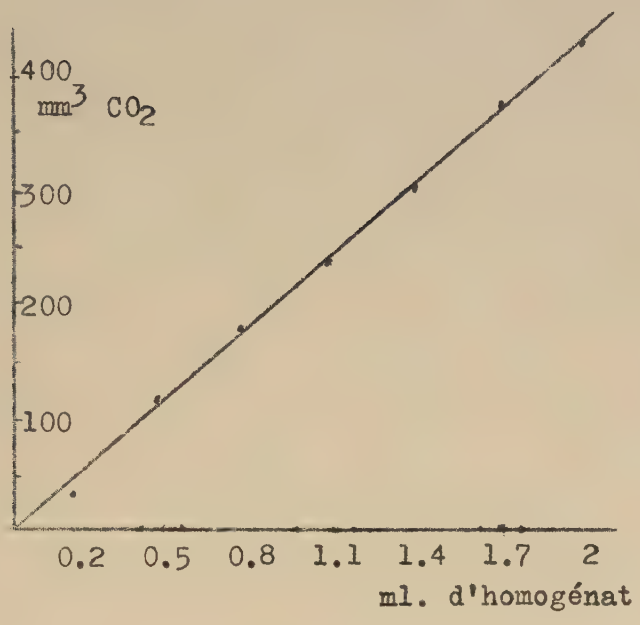


Fig. 5 : Proportionalité entre la vitesse de réaction et la concentration dans la décarboxylation de l'A.C.S. par le foie du rat.

1 ml d'homogénat = 240 mg (poids d'organe frais)

0,8 ml de tampon phosphates 0.25 M pH: 6,8

0,2 ml ACS neutralisé concentration finale dans la cellule 10^{-2} M.

Incubation : 40 minutes.

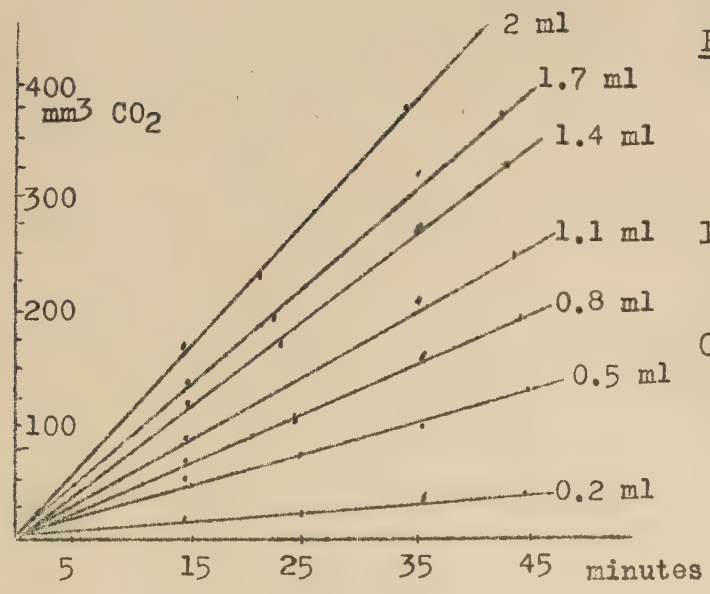


Fig. 6 : Effet de la concentration en enzyme sur la décarboxylation de l'ACS dans le foie du rat

1 ml d'homogénat = 240mg (poids d'organe frais)

0,8 ml de tampon phosphates 0.25 M pH: 6,8

ACS 10^{-2} M.

B - Influence de la dialyse.

Les suspensions d'organes dialysées décarboxylent encore de façon active. Il y a cependant une certaine perte d'activité, comme le montre la figure 7, due en partie au vieillissement de l'organe pendant le temps de la dialyse. Malgré cet inconvénient, la dialyse a dû être utilisée pour l'étude de la décarboxylation dans certains organes, en particulier dans le foie du lapin, où il faut supprimer les acides cétoniques du milieu, qui réalisent de façon rapide la transamination désulfinante de l'acide cystéinesulfinique, et interfèrent donc avec la décarboxylation.

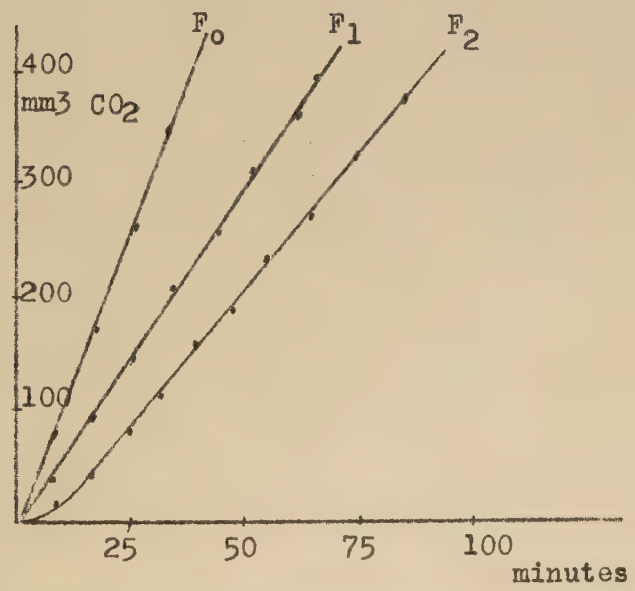


Fig. 7 : Influence de la dialyse sur la décarboxylation, dans le foie du rat, de l'A.C.S.

2 ml homogénat (poids d'organe frais : 280 mg)
0,8 ml tampon phosphates 0.25 M pH : 6,8
A.C.S. 10^{-2} M.

F_0 = Extrait frais.

F_1 = Extrait maintenu dans les conditions de la dialyse (à 4º)

F_2 = Extrait dialysé 24h contre H_2O + 0,01 % CO_3HNa à 4º.

C - Activité des poudres acétoniques.

La décarboxylase contenue dans le foie du lapin perd environ les 2/3 de son activité initiale après traitement à l'acétone.

Tableau 3

Préparation de foie	mm^3 CO_2 / heure / 500^{mg} (poids de l'organe frais à l'origine).
Suspension de foie de lapin dialysée	46
Suspension de poudre acétonique dialysée	16

Tampon phosphate pH : 6,8 - Acide cystéinesulfinique 10^{-2} M

D - Répartition du système décarboxylant dans quelques organes du lapin et du rat.

Le tableau 4 donne les valeurs moyennes des Q_{CO_2} /heure/gr d'organe frais, obtenues à partir du foie, du rein, du cerveau et du coeur de lapin et de rat (cf p. 38)

Ce tableau montre que le foie du rat soumis à une alimentation normale est beaucoup plus actif que tous les autres organes étudiés. Le foie et le cerveau, et du rat et du lapin, décarboxylent l'acide L-cystéinesulfinique. Le rein du lapin est actif tandis que le rein du rat est totalement inactif. Chez aucun des deux animaux, le coeur ne possède de décarboxylase de l'acide L-cystéinesulfinique.

II - Rôle du phosphate de pyridoxal dans la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique, chez l'animal normal et chez l'animal carencé en vitamine B_6.

A - Animal normal.

L'effet de l'addition de phosphate de pyridoxal sur différentes suspensions d'organes utilisées est montré par les courbes des figures 8, 9, 10, 11, 12, et par le tableau 4.

Tableau 4

Moyennes des Q_{CO_2} /heure/gr. de poids frais, obtenus à partir des organes du lapin et du rat.

Animal	Foie		Rein		Cerveau		Coeur	
	seul	+ P.P.	seul	+ P.P.	seul	+ P.P.	seul	+ P.P.
Rat	1920	1920	0	0	59	340	0	0
Lapin	84	90	161	330	20	326	0	-

Tampon phosphate pH : 6,8 - Acide Cystéinesulfinique 10^{-2} M - PP = 100 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal

Sauf dans le cas du rein du rat qui ne décarboxyle pas l'acide L-cystéinesulfinique, et sur lequel l'addition de phosphate de pyridoxal n'a pas d'effet, l'influence du phosphate de pyridoxal est identique sur les organes correspondants du lapin et du rat, c'est-à-dire :

- il n'y a pas d'augmentation de la vitesse initiale de la décarboxylation dans le foie par addition de phosphate

de pyridoxal aux suspensions. (Fig.8 et 9)

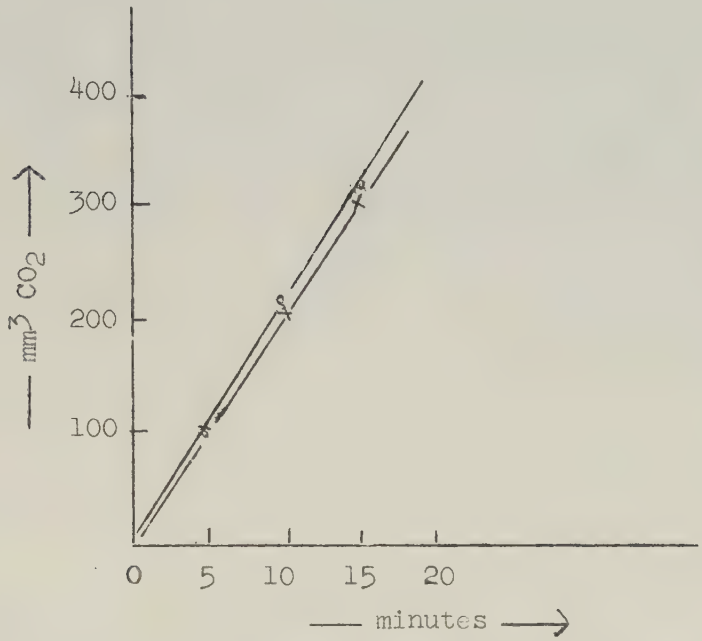


Fig. 8 - Influence de l'addition de phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique dans le foie du rat.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 480 mg)
0.8 ml tampon phosphates 0.25 M pH = 6,8
Acide Cystéinesulfinique 10^{-2}M - Phosphate de pyridoxal = 100 γ de sel de Ca

x = sans phosphate de pyridoxal
o = avec phosphate de pyridoxal

On note toutefois que les milieux auxquels on ajoute du phosphate de pyridoxal conservent souvent plus longtemps leur vitesse initiale de décarboxylation dans le cas des suspensions de foie où l'activité enzymatique est faible, (suspensions de foie de rats "témoins" du régime de carence en vitamine B_6 (voir plus loin fig. 13)).

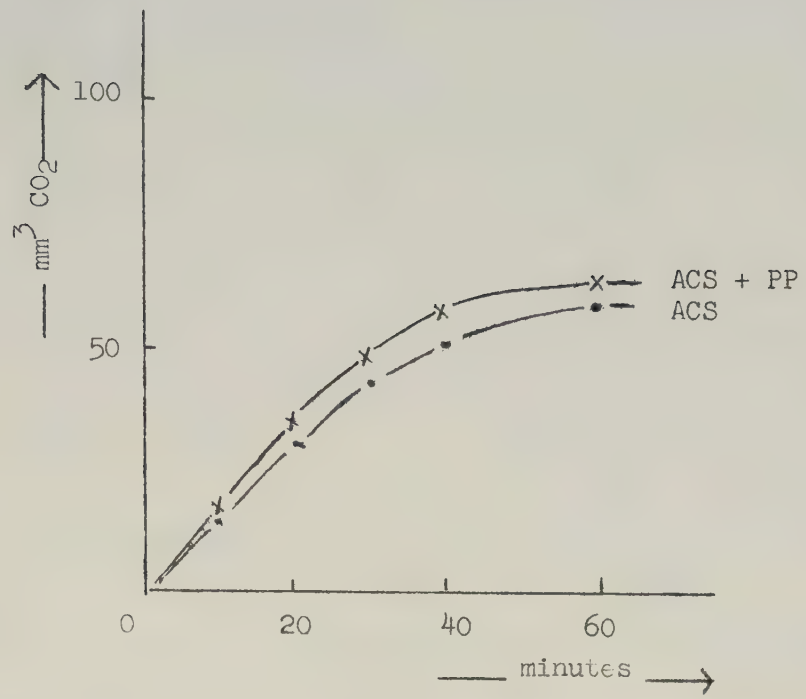


Fig.9 - Influence de l'addition de phosphate de pyridoxal (PP) sur la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique (ACS) dans le foie du lapin.

2 ml d'homogénat (poids sec = 300 mg)
0,8 ml tampon phosphate 0,25 M pH = 6,8
Acide cystéinesulfinique 10^{-2}M
100 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal

- il y a augmentation très nette de la vitesse initiale de décarboxylation par addition de phosphate de pyridoxal aux suspensions de cerveaux. (fig.10)

L'influence de la concentration en phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation dans le cerveau du rat est montrée dans la fig. 11.

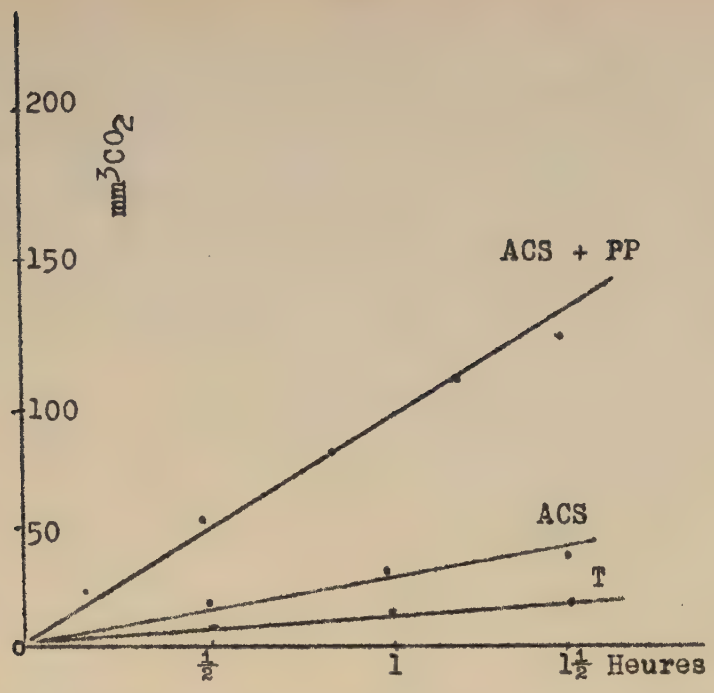


Figure 10 : Influence de l'addition de phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique dans le cerveau du rat.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 200 mg)
0.8 ml tampon phosphate 0.25 M pH : 6,8
Acide Cystéine-sulfinique 10^{-2}M = ACS
Phosphate de pyridoxal = PP = 100 γ de sel de Ca.

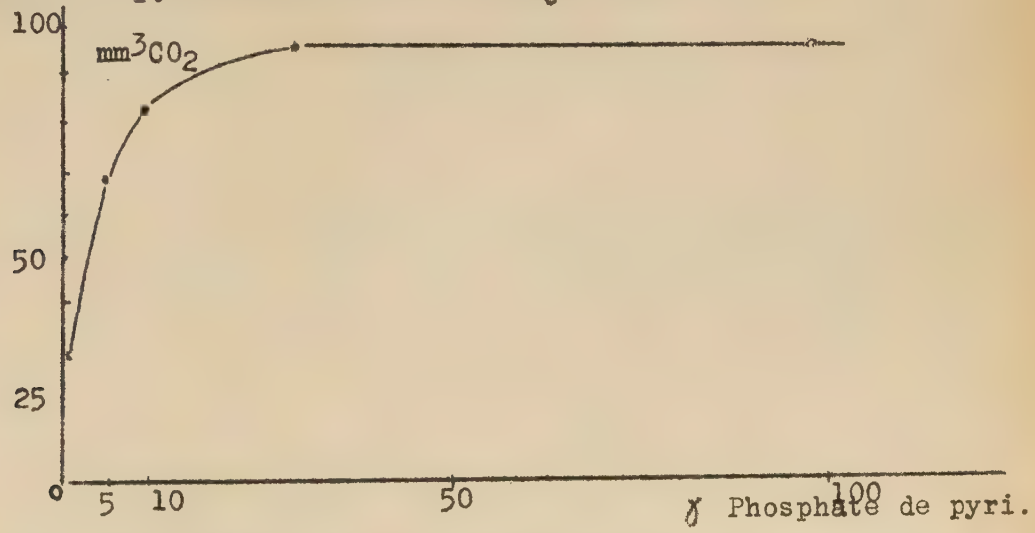


Figure 11 : Influence de la concentration en phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique dans le cerveau du rat.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 160 mg)
0,8 ml tampon phosphate 0,25 M pH : 6,8
Acide Cystéine-sulfinique 10^{-2}M.

- la vitesse initiale de la décarboxylation dans le rein du lapin est également augmentée par addition de phosphate de pyridoxal, comme le montre la Figure 12.

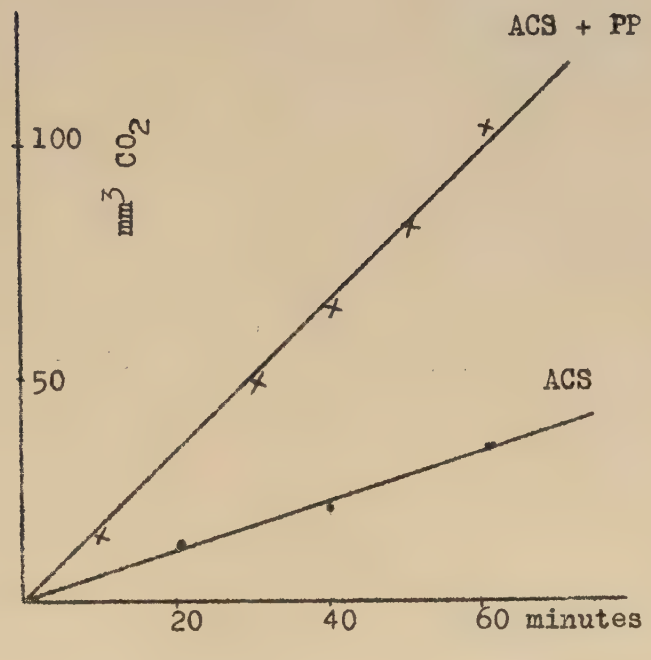


Figure 12 : Influence de l'addition de phosphate de pyridoxal sur la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique dans le rein du lapin.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 440 mg)
0.8 ml tampon phosphate 0.25 M pH : 6,8
Acide Cystéinesulfinique 10^{-2}M = ACS
100 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal = PP.

B - Animal carencé en vitamine B_6

La répercussion de la carence en vitamine B_6 sur la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique dans les organes a été étudiée sur le foie et le cerveau du rat. Les résultats sont donnés par les courbes des figures 13 et 14.

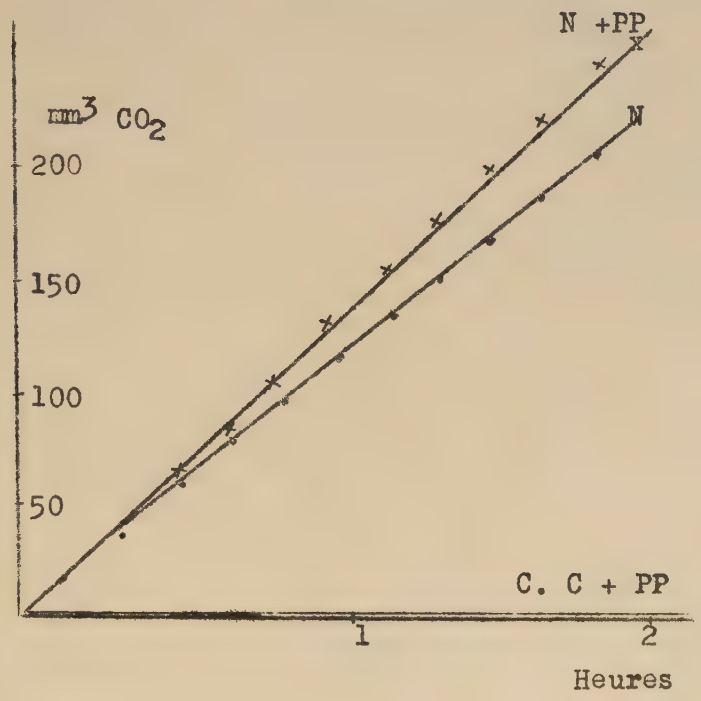


Fig.13 : Décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique par le foie du rat normal (N) et du rat carencé en vitamine B_6 (C), avec ou sans addition de phosphate de pyridoxal(PP)

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 450 mg)
0.8 ml tampon phosphate 0,25 M pH : 6.8
Acide Cystéinesulfinique 10^{-2}M - Phosphate de pyridoxal 100 γ de sel de Ca.

Le foie du rat carencé ne décarboxyle pas l'acide L-cystéinesulfinique - L'addition de phosphate de pyridoxal

ne redonne pas d'activité au tissu. D'autres substances et des extraits d'organes bouillis ont été essayés pour la réactivation, en particulier l'adénosine-triphosphate (ATP), la pyridoxamine + ATP, la biotine + Adénine 5. Phosphate, un extrait bouilli de cerveau de rat normal + phosphate de pyridoxal, un extrait bouilli de foie de rat normal et un extrait de levure de boulangerie. Dans aucun cas, nous n'avons obtenu une réactivation, même partielle, de la décarboxylase.

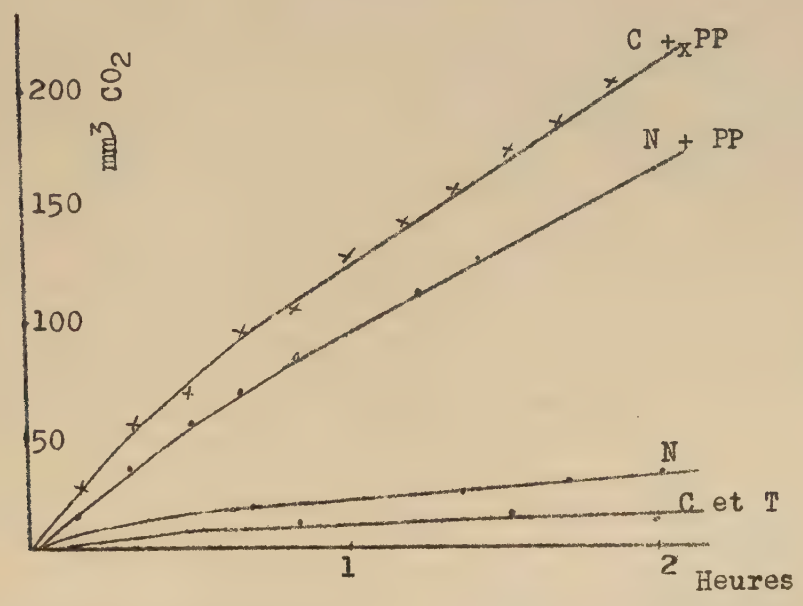


Fig.14 : Décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique par le cerveau du rat normal (N) et du rat carencé en vitamine B_6 (C). Réactivation par le phosphate de pyridoxal (P.P.)

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 228 mg)
0.8 ml tampon phosphate 0.25 M pH : 6.8
Acide Cystéinesylfinique 10^{-2}M
Phosphate de pyridoxal : 100 γ de sel de Ca
T = cellule témoin sans ACS

Les suspensions de cerveaux de rats carencés se comportent d'une manière très différente : de telles suspensions, seules, ne décarboxylent plus l'acide L-cystéinesulfinique; mais l'addition de phosphate de pyridoxal leur redonnent la même activité que celle présentée par les suspensions de cerveau des rats témoins (fig. 14)

Le tableau 5 indique les valeurs des Q_{CO2}/heure/gr. de poids frais des différentes préparations d'organes, obtenues,

- soit à partir de rats recevant l'alimentation courante des animaux de laboratoire,
- soit à partir de rats "témoins" du régime de la carence en vitamine B_6, d'un poids voisin des précédents,
- soit à partir de rats carencés en vitamine B_6

TABLEAU 5

Valeurs des Q_{CO2}/heure/gr de poids frais des organes du rat normal et du rat carencé en vitamine B_6.

	Foie		Cerveau	
	seul	+ PP	seul	+ PP
Rat nourri "ad lib."	1920	1920	59	340
Rat "témoin"	185	220	56	290
Rat carencé en Vitamine B_6	0	0	0	303

Ce tableau résume ce qui a été dit précédemment. En outre, il indique la grande différence d'activité de décarboxylation, qui existe, pour les préparations de foie, entre l'animal nourri "ad libitum" et l'animal "témoin" du régime de carence.

Après deux mois de carence en vitamine B_6, certains rats, présentant tous les signes de l'avitaminose, reçoivent de nouveau dans leur alimentation, par gavage, de la pyridoxine (15 γ par jour). Leur foie est analysé après 45 jours de gavage.

Les suspensions de foie présentent à nouveau une activité de décarboxylation vis-à-vis de l'acide L-cystéine-sulfinique, activité faible mais sensible : pour le même poids d'organe frais, la vitesse initiale de décarboxylation observée avec ces suspensions représente sensiblement 1/4 de la vitesse obtenue avec les préparations provenant des rats témoins du régime. Il y a néanmoins mise en évidence de la régénération de l'enzyme dans le foie du rat qui, ayant été carencé, reçoit de nouveau de la vitamine B_6.

III - Comparaison des décarboxylations de l'acide L-glutamique, de l'acide L-cystéinesulfinique et de l'acide L-cystéique dans quelques organes du lapin et du rat.

Le pH optimum des décarboxylases de l'acide glutamique (28) et de l'acide cystéinesulfinique (cf chap.III § I) est de 6.8. Le pH optimum de la décarboxylase de l'acide cystéique est de 7,3 (29)

A - Activité des suspensions de foie -

Les figures 16, 17 et 18 illustrent les résultats obtenus.

L'acide glutamique ne subit aucune décarboxylation, aussi bien chez le rat que chez le lapin.

L'acide cystéinesulfinique et l'acide cystéique sont décarboxylés, mais la vitesse de décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est toujours de beaucoup supérieure à celle de l'acide cystéique, quelle que soit la concentration en substrat ou le pH auquel on opère.

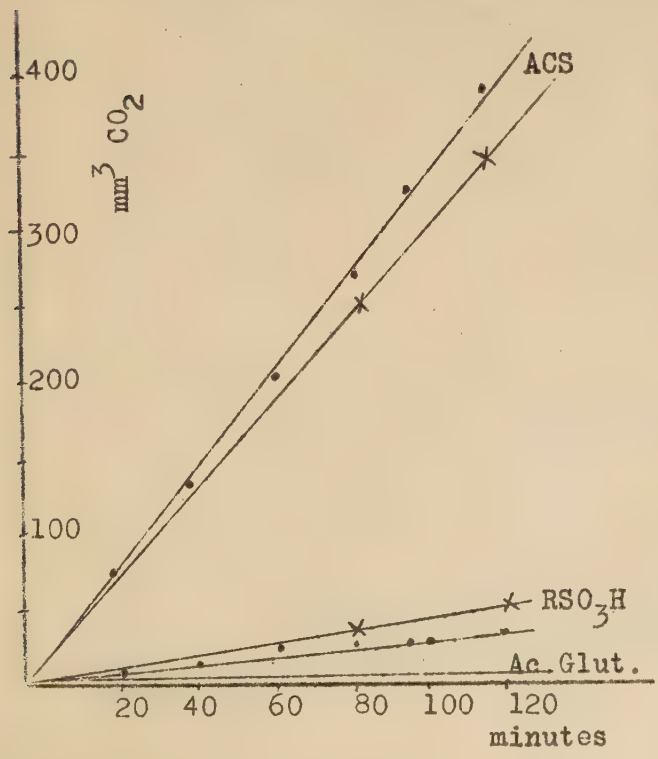


Fig.16 : Décarboxylations comparées dans le foie du rat -

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 200 mg)

0,8 ml tampon phosphate 0.25 M

•—• = pH 6,8

x-x = pH 7.3 -

Substrat 10^{-2}M

ACS = Acide Cystéinesulfinique - R SO_3H = Acide Cystéique.

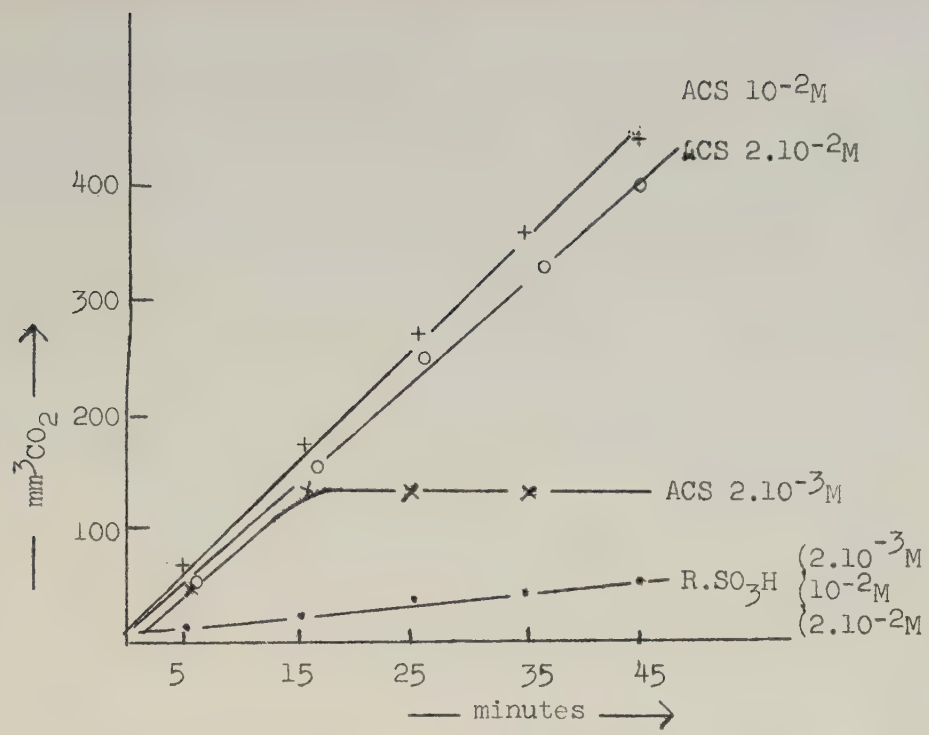


Figure 17 : Décarboxylations comparées de l'acide cystéine-sulfinique (ACS) et de l'acide cystéique (RSO_3H) à différentes concentrations dans le foie du rat.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 280 mg)
0,8 ml de tampon phosphate 0,25 M pH : 6,8

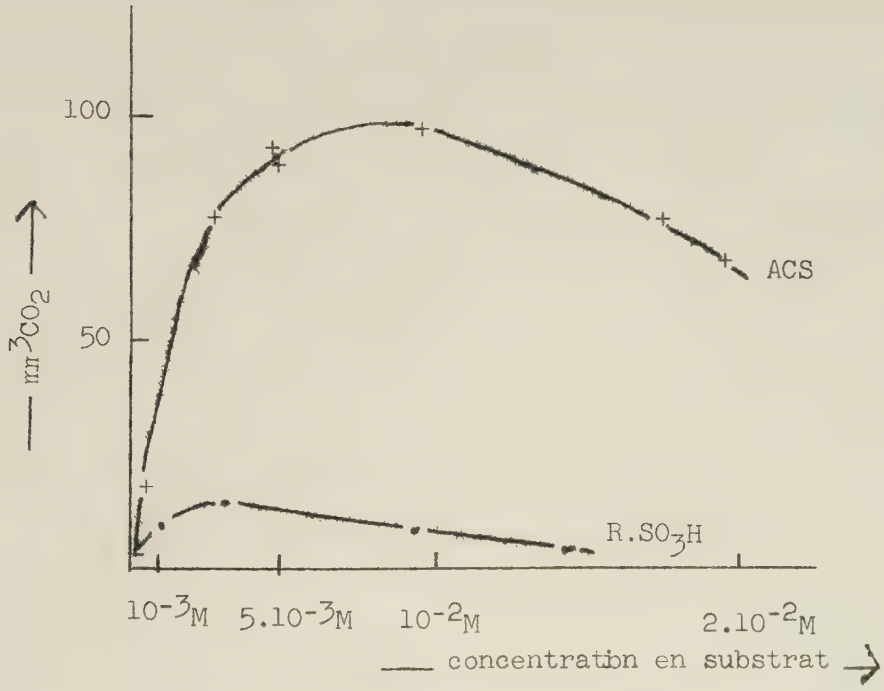


Figure 18 : Décarboxylations comparées de l'acide cystéine-sulfinique (ACS) et de l'acide cystéique (RSO_3H) dans le foie du lapin.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 1.000 mg)
0,8 ml tampon phosphate 0,25 M pH 6,8

B - Activité des suspensions de rein -

Dans le rein du lapin, il y a, comme nous l'avons vu, décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique. La décarboxylation de l'acide cystéique est minime ou nulle, la décarboxylation de l'acide glutamique ne se produit pas. (figure 19).

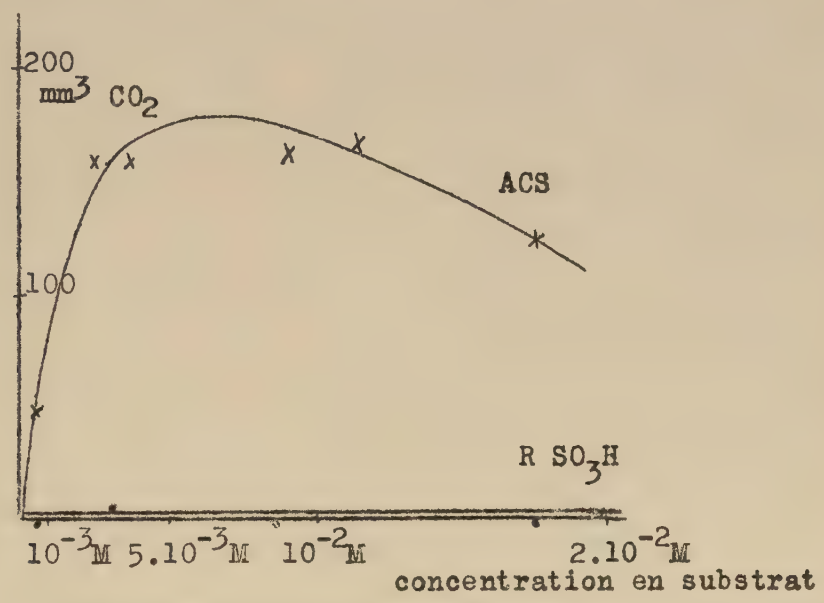


Figure 19. Décarboxylations comparées
Acide Cystéine-Sulfinique (ACS) et Acide Cystéique (RSO_3H) dans le rein du lapin.
2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 400 mg)
0.8 ml tampon phosphates 0.25 M pH 6.8
Temps : 60 minutes.

C - Activité des suspensions de cerveau -

Les mêmes phénomènes ont lieu chez le lapin et chez le rat.

Les trois acides aminés étudiés sont décarboxylés, mais à des vitesses différentes. La vitesse la plus grande est celle de la décarboxylation de l'acide glutamique, puis de l'acide cystéinesulfinique et, en dernier lieu, de l'acide cystéique.

L'addition de phosphate de pyridoxal augmente considérablement l'activité dans les trois cas, sans changer pourtant le rapport des vitesses, qui n'est pas non plus sensiblement modifié par un changement de pH, figures 20 et 21.

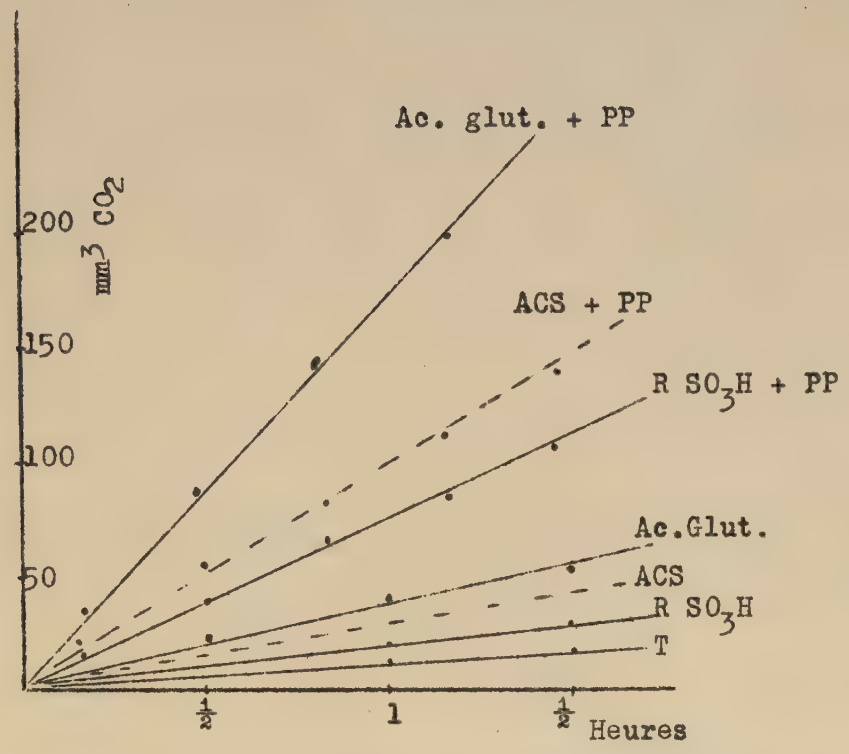


Figure 20 : Décarboxylations comparées dans le cerveau du lapin.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 880 mg)
0.8 ml tampon phosphates 0.25 M pH = 6.8
Substrat : concentration finale 10^{-2}M
PP = 100 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal

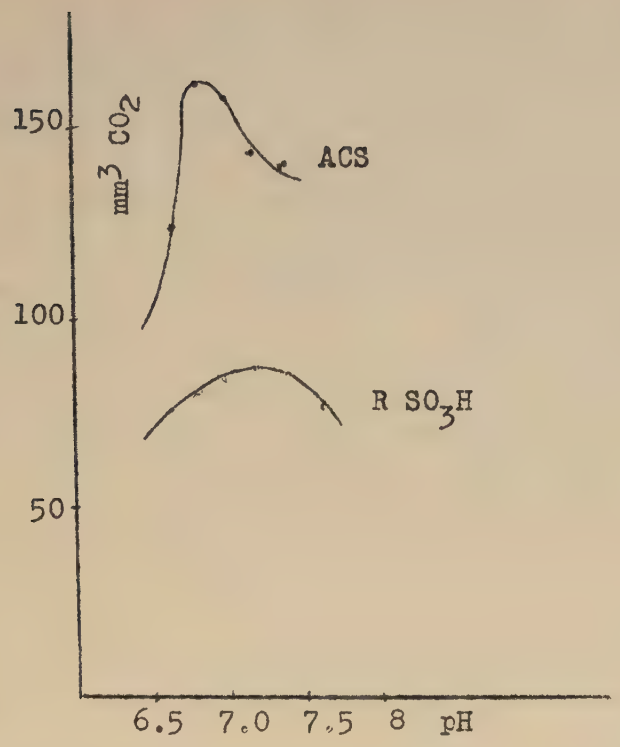


Figure 21: Décarboxylations comparées de l'acide cystéine-sulfinique et de l'acide cystéique, à différents pH., dans le cerveau du lapin.

2 ml d'homogénat (poids d'organe frais = 500 mg)
0.8 ml tampon phosphates 0.25 M pH : 6.0
Substrat : concentration finale 10^{-2}M.200 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal
Temps = 60 minutes.

Les résultats essentiels de notre étude sur les décarboxylations à partir des suspensions d'organes de lapin et de rat sont les suivants :

1) les conditions optima de fonctionnement de la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique sont déterminées : pH 6,8, tampon phosphate, concentration en substrat 10^{-2}M.

   La dialyse ne supprime pas l'activité de décarboxylation des préparations d'organes utilisées.

   Le traitement par l'acétone fait baisser de 70% l'activité des préparations.

2) l'étude de la répartition du système décarboxylant l'acide L-cystéinesulfinique dans les différents organes fait ressortir l'activité tout à fait spéciale du foie du rat. Le rein du rat est inactif et, en cela, a le même comportement que vis-à-vis de l'acide cystéique (29).

3) l'addition de phosphate de pyridoxal aux préparations de foie provenant d'animaux normaux n'augmente pas l'activité de la décarboxylase de l'acide cystéinesulfinique.

   Elle l'augmente au contraire considérablement dans le cerveau.

   L'addition de phosphate de pyridoxal aux préparations d'organes, provenant de rats carencés en vitamine B_6, qui ne décarboxylent plus l'acide cystéinesulfinique, ne redonne pas d'activité aux suspensions de foie, mais régénère l'activité des suspensions de cerveau.

   Nous discutons plus loin ce problème de la différence de comportement des organes vis-à-vis du phosphate de pyridoxal.

4) l'étude des décarboxylations comparées de l'acide L-glutamique, de l'acide L-cystéinesulfinique et de l'acide

L-cystéique montre que l'acide glutamique est décarboxylé seulement dans le cerveau et à une vitesse plus grande que les deux autres substrats.

Dans tous les cas et à tous les pH, la vitesse de la décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique est supérieure à celle de la décarboxylation de l'acide cystéique. Dans certains organes, où la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est nette (foie et rein du lapin), la décarboxylation de l'acide cystéique est minime ou nulle.

Nous discutons également plus loin des conclusions à tirer de ces faits.

CHAPITRE IV

RÔLE DU PHOSPHATE DE PYRIDOXAL DANS LES TRANSAMINATIONS DE L'ACIDE L-CYSTEINESULFINIQUE

ETUDE COMPARATIVE DES TRANSAMINATIONS DE L'ACIDE L-CYSTEINE-SULFINIQUE ET DE L'ACIDE L-CYSTEIQUE.

On sait que le groupement SO_2 de l'acide cystéinesulfinique n'est susceptible d'être libéré de la molécule qu'après transamination de cette dernière et formation d'un acide cétonique (3). Il y a donc un rapport direct entre les phénomènes de transamination et la genèse des sulfites et des sulfates dans l'organisme.

Le rôle du phosphate de pyridoxal dans les phénomènes de transamination a été discuté : d'après les résultats de Schlenk et Snell (30), l'intensité des transaminations est nettement diminuée chez les animaux carencés en vitamine B_6 alors que, d'après les travaux de Mc Henry et Col (31) (32) et Kritzmann (33), la carence n'affecte que certaines transaminases et d'une façon limitée.

Dans le cas de l'acide cystéinesulfinique, on sait d'une part, que l'addition de phosphate de pyridoxal n'augmente pas la rapidité de la transamination désulfinante dans le foie (3), d'autre part, que la transamination acide cystéinesulfinique - acide α-cétoglutarique, déterminée par le dosage du sulfite, n'est pas modifiée dans le foie du rat carencé en vitamine B_6 (8).

Nous recherchons ici dans quelle mesure la formation d'alanine est, elle, affectée par la carence, sachant que l'alanine peut être formée par les transaminations suivantes (3):

Ac. Pyruvique + Ac. Glutamique → Alanine + Ac. α cétoglutarique

Ac. Pyruvique + Ac. Cystéinesulfinique → Alanine + Ac. β sulfinylpyruvique

Des conclusions sont tirées de nos résultats au sujet de la nature même des transaminations auxquelles peut participer l'acide cystéine-sulfinique.

D'autre part, des travaux déjà anciens (38) ont établi, à l'aide d'expériences effectuées in vivo, que l'acide cystéique n'est pas un intermédiaire dans le passage du soufre de la cystéine au sulfate, et cependant l'acide cystéique participe également aux réactions de transamination.

Nous avons voulu ici effectuer une comparaison entre les transaminations auxquelles prennent part l'acide cystéinesulfinique et l'acide cystéique. En identifiant les acides aminés et les acides cétoniques formés au cours des réactions, nous avons confirmé que l'acide cystéique n'intervient pas dans la genèse des sulfates, l'acide β sulfopyruvique n'étant pas désulfoné dans les conditions réalisées.

I - Rôle du phosphate de pyridoxal dans les transaminations de l'acide L-cystéinesulfinique -

Le rôle du phosphate de pyridoxal est déterminé par l'étude des transaminations effectuées par des préparations de foies provenant de rats normaux et de rats carencés en vitamine B_6 - L'effet de l'addition de phosphate de pyridoxal à ces préparations est également analysé.

Des dosages de SO_2 et d'alanine dans le cas de l'acide cystéinesulfinique, ou des dosages d'alanine seule dans les autres cas, ont servi à l'étude des transaminations (voir Techniques § D).

Les principaux résultats obtenus sont reportés dans les tableaux 6 et 7 -

Le tableau 6 indique que, dans le cas où l'acide cétonique, introduit avec l'acide cystéinesulfinique, est l'acide α-cétoglutarique, non seulement la production de sulfite, mais la production d'alanine est sensiblement la même dans le foie du rat normal et dans le foie du rat carencé en vitamine B_6.

TABLEAU 6

Production de SO_2 et d'alanine par transamination de l'acide Cystéinesulfinique avec l'acide α cétoglutarique dans le foie du rat normal (N) et du rat carencé en vitamine B_6 (C) -

750 mg foie dialysé - Tampon phosphate pH = 7,3
Acide Cystéinesulfinique et Acide α cétoglutarique 10^{-2}M
PP = 25 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal. 2 h.

	μmol SO_2	μmol alanine
Foie N ACS - α-cétogl.	82	86
Foie N ACS - α-cétogl.-P.P.	81	86
Foie C ACS - α-cétogl.	83	76
Foie C ACS - α-cétogl.-P.P.	88	72

On a vu que cette production d'alanine résultait d'une transamination, soit entre l'acide pyruvique et l'acide glutamique, soit entre l'acide pyruvique et l'acide cystéinesulfinique. Il apparaît donc que l'une au moins de ces réactions n'est pas affectée par la carence.

Le tableau 7 montre qu'en effet, la transamination Acide Pyruvique - Acide glutamique n'est pas touchée par la carence. Elle est moins rapide que la transamination Acide Pyruvique - Acide cystéinesulfinique. Cette dernière transamination est nettement diminuée dans le foie du rat carencé, et l'addition de phosphate de pyridoxal ne permet pas de rétablir une activité égale à celle obtenue avec du foie de rat normal.

TABLEAU 7

Production de SO_2 et d'alanine, ou d'alanine seule, par transamination dans le foie du rat normal (F_N) et du foie carencé en vitamine B_6 (F_C).

750 mg foie dialysé - Tampon phosphate pH = 7.3
Substrats 10^{-2}M
PP = 100 γ de sel de Ca de phosphate de pyridoxal. 2h.

	μ mol SO_2	μ mol alanine
F_N - Pyr. Glut.	-	14
F_N - Pyr. Glut. P.P.	-	14
F_C - Pyr. Glut.	-	13
F_C - Pyr. Glut. P.P.	-	14
F_N - Pyr. ACS	48	51
F_N - Pyr. ACS - P.P.	53	52
F_C - Pyr. ACS	20	18
F_C - Pyr. ACS - P.P.	23	23

De ces résultats, on peut conclure que le phosphate de pyridoxal joue un rôle limité, mais certain, dans les transaminations auxquelles participe l'acide cystéinesulfinique - La transamination Acide Pyruvique-Acide Cystéinesulfinique semble être la transamination la plus sensible à la carence en vitamine B_6, plus sensible que la transamination Acide Pyruvique-Acide glutamique sur laquelle nous n'avons pas constaté d'effet de la carence. Ces faits sont d'ailleurs une preuve indirecte de l'existence d'une transaminase directe Acide Pyruvique-Acide Cystéinesulfinique, dont nous ne pouvions jusqu'alors affirmer la présence, étant donnée la complexité du milieu enzymatique utilisé.

II - Etude comparative des transaminations de l'acide L-cystéinesulfinique et de l'acide L-cystéique.

Cette étude a été faite par l'analyse chromatographique sur papier des acides aminés et des acides cétoniques formés par les transaminations des substrats (Acide cystéique-Acide Cystéinesulfinique) avec l'acide α-cétoglutarique (concentration des trois substances = 10^{-2}M), dans le foie du lapin.

a) - Mise en évidence des acides aminés formés

Le schéma 4 représente la photo d'un chromatogramme obtenu au cours d'une expérience. Dans la cellule où l'acide cystéinesulfinique a été introduit :

- au bout de 15 minutes (point C), on note une formation nette d'acide glutamique et une apparition d'alanine. Il reste encore de l'acide cystéinesulfinique non métabolisé,
- au bout de 2 heures (point B) tout l'acide cystéinesulfinique a disparu. L'acide glutamique est toujours présent et la formation d'alanine est beaucoup plus considérable.

Dans la cellule où, dans les mêmes conditions l'acide cystéique a été introduit (point A),

- après 2 heures, il reste encore des quantités importantes de ce substrat, qui a été peu métabolisé.

  L'acide glutamique est le seul acide aminé apparu.

b) - Mise en évidence des acides cétoniques

1 - Sous forme de 2-4-Dinitrophénylhydrazones

Le schéma 5 montre que,

- dans le cas de l'acide cystéinesulfinique, il y a

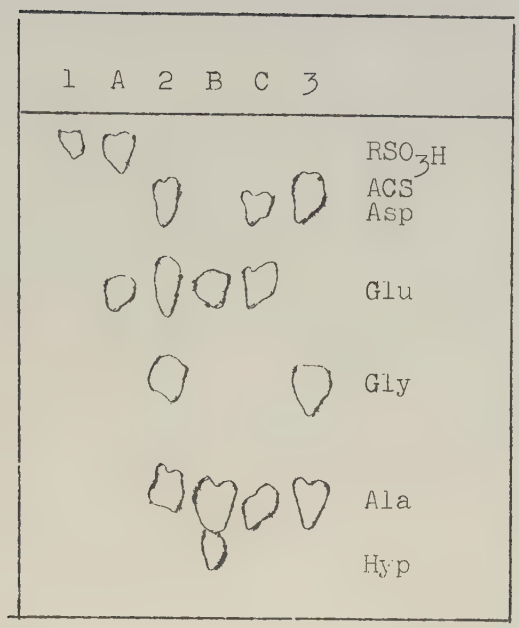


Schéma 4

formation très importante d'acide pyruvique (point B)

- dans le cas de l'acide cystéique (point A), il reste au contraire beaucoup d'acide α-cétoglutarique dans le milieu, et on ne note qu'une faible production d'acide pyruvique. Cette formation, même faible, d'acide pyruvique, sera discutée ultérieurement.

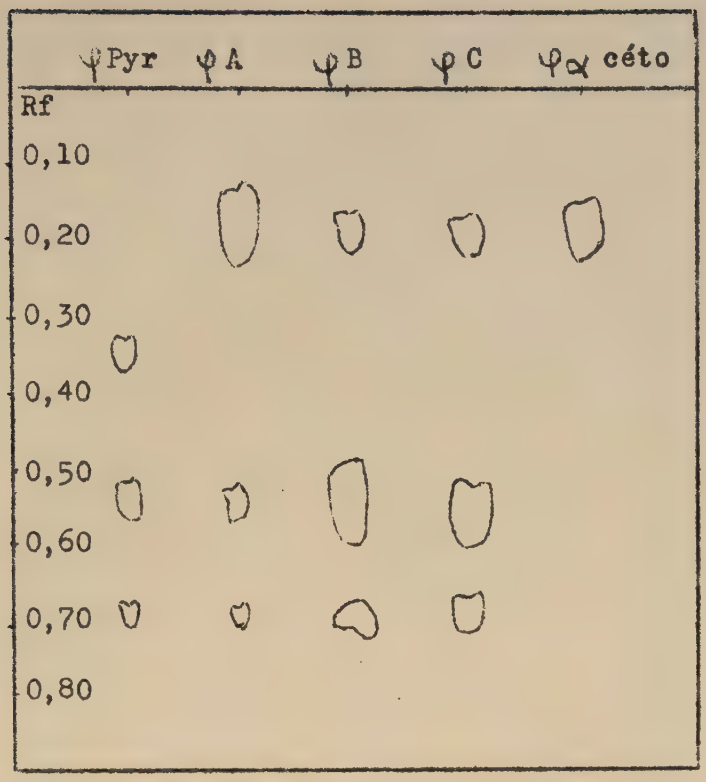


Schéma 5 : Chromatogramme des 2-4-Dinitrophénylhydrazones provenant des acides cétoniques formés par les transaminations de l'acide cystéinesulfinique (ACS) et de l'acide cystéique (RSO_3H) avec l'acide α-cétoglutarique.

Papier Whatman nº 3 - Butanol-Ethanol -NH_4OH N/20 (70:10:20)

A = RSO_3H + α céto (2h.) B = ACS + α céto (2h.) -
C = ACS + α céto (15')

2 - sous forme d'acides cétoniques libres

Sur le schéma du chromatogramme (schéma 6), on retrouve les mêmes résultats que sur le schéma précédent, en ce qui concerne la cellule dans laquelle on a introduit de l'acide cystéinesulfinique, à savoir : (point B)

- présence d'une faible quantité d'acide α-cétoglutarique,

- présence d'une quantité plus importante d'acide pyruvique,

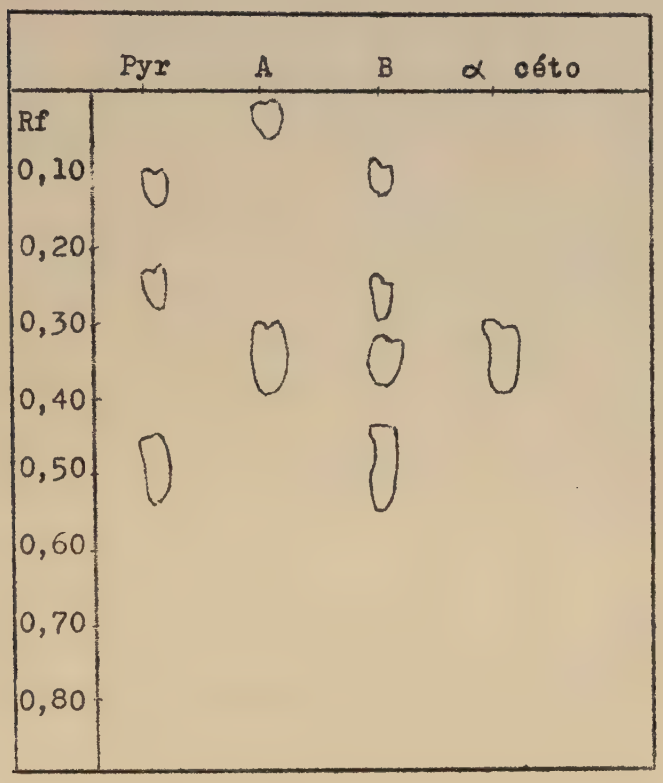


Schéma 6 : Chromatogramme des Acides cétoniques, sous forme libre, provenant des transaminations de l'acide cystéinesulfinique (ACS) et de l'acide cystéique (RSO_3H) avec l'acide α céto-glutarique.

Papier Whatman nº 1 - Butanol - Acide formique-eau (75 : 15: 10) - Réactif : Orthophénylènediamine. U.V.
A = R SO_3H + α-céto - B = ACS + α céto

Dans le cas de l'acide cystéique, on note,

- une quantité importante d'acide α cétoglutarique, ce qui correspond également au schéma précédent,
- mais il n'existe pas ici d'acide pyruvique. On remarque par contre une tache à Rf = 0,04

De ces résultats, on peut conclure :

1º/ que la vitesse avec laquelle l'acide cystéinesulfinique est transaminé par les préparations de foie de lapin est beaucoup plus grande que la vitesse de la transamination de l'acide cystéique.

2º/ qu'il n'y a pas, dans le cas de l'acide cystéique, de formation d'alanine qui résulterait d'une transamination de l'acide pyruvique. Puisque le milieu enzymatique est susceptible de réaliser au moins la transamination : Acide Pyruvique-Acide Glutamique, on peut conclure qu'il n'y a pas eu formation d'acide pyruvique, donc que l'acide β-sulfopyruvique n'a pas subi de désulfonation.

L'existence sur nos chromatogrammes de la 2-4-dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique semble donc anormale. La méthode même de préparation des 2-4-dinitrophénylhydrazones, qui est une méthode assez brutale (voir Techniques § F) est sans doute responsable de la formation d'acide pyruvique aux dépens de l'acide β sulfopyruvique. On sait en effet (15) que certains acides cétoniques sont dégradés au cours des opérations effectuées. L'analyse des acides cétoniques sous forme libre confirme ce point de vue puisque, dans ce cas, on ne trouve pas d'acide pyruvique, mais on note l'apparition d'un acide cétonique que nous avons toutes raisons de penser être l'acide β sulfopyruvique.

CONCLUSIONS

Les résultats essentiels de notre travail sont les suivants :

I - Il est possible de mettre en évidence l'acide cystéinesulfinique dans le cerveau du rat. Cet intermédiaire, jusqu'à présent hypothétique, de la dégradation des acides aminés soufrés, peut être caractérisé dans un tissu d'animal soumis à une alimentation normale. On peut alors affirmer que toutes les études antérieures, effectuées sur le métabolisme de cet acide aminé dans l'organisme, ont un intérêt physiologique puisqu'elles portent sur un intermédiaire qui se forme réellement dans l'organisme.

Le fait de retrouver de l'acide cystéinesulfinique dans le cerveau a une correspondance probable avec l'intensité relativement faible du métabolisme de cet acide aminé dans cet organe. Faute d'une quantité suffisante, même chez l'animal normal, de phosphate de pyridoxal, la décarboxylation ne s'y fait que faiblement et il ne s'y produit pas d'autres dégradations importantes.

II - L'hypotaurine (acide 2-aminoéthanesulfinique), résultant de la décarboxylation enzymatique de l'acide L-cystéinesulfinique, est isolée à partir de son milieu biologique de formation, grâce à la mise au point de techniques de séparation sur des échangeurs d'ions, en particulier la Permutite 50 et l'Amberlite IRA.400, des différents acides aminés formés au cours du métabolisme de l'acide L-cystéinesulfinique - L'analyse centésimale de l'hypotaurine isolée est satisfaisante - Son identité avec le produit synthétique est mise en évidence.

III - La décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique, qui est particulièrement rapide dans le foie du rat normal,

est sous la dépendance du phosphate de pyridoxal. A ce propos, quelques résultats intéressants sont remarqués :

a) l'activité, in vitro, des organes de l'animal normal (lapin et rat), est augmentée ou non par l'addition de phosphate de pyridoxal selon la nature de l'organe : la décarboxylase du foie n'est pas activée, tandis que la décarboxylase du cerveau est fortement activée par l'addition de phosphate de pyridoxal.

b) chez l'animal carencé en vitamine B_6, il y a suppression de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique dans tous les organes, ce qui coïncide avec la disparition de l'hypotaurine et de la taurine dans l'urine.
Les préparations de foie ne sont pas réactivables tandis que les préparations de cerveau sont parfaitement réactivables par le phosphate de pyridoxal.

Le comportement des suspensions de cerveau, au point de vue de l'activation ou de la réactivation de la décarboxylase de l'acide cystéinesulfinique, par le phosphate de pyridoxal, est analogue à celui qui a été observé au cours des études faites sur la décarboxylase de l'acide glutamique dans le même organe (28).

Par contre, le comportement des suspensions de foie pose un problème. Il est d'abord certain que les substances dérivées de la pyridoxine exercent une influence primordiale sur la décarboxylase de l'acide cystéinesulfinique, même dans le foie, puisque l'absence de pyridoxine dans un régime provoque la disparition complète de l'activité du système décarboxylant dans le foie de l'animal soumis à ce régime. Le fait que ni les substances essayées, ni même les extraits bouillis d'organes provenant d'animaux normaux, ne puissent redonner d'activité de décarboxylation au foie du rat carencé, fait penser que la frac-

tion protéinique de l'enzyme a dû elle aussi être touchée dans cet organe par la carence. Il est prématuré de préciser quelle est la façon exacte dont le phosphate de pyridoxal agit sur la protéine de la décarboxylase hépatique. On peut néanmoins émettre certaines hypothèses qui devront être vérifiées.

En premier lieu, on sait que les cellules du tissu hépatique et, partant, les protéines qu'elles contiennent, sont renouvelées rapidement, tandis que les cellules et les protéines du cerveau ne le sont pas. Il est possible que le phosphate de pyridoxal agisse sur la synthèse même de la protéine, et donc que son absence dans les tissus ait une répercussion plus profonde sur la décarboxylase du foie que sur la décarboxylase du cerveau.

On peut envisager également, comme autre hypothèse, que le phosphate de pyridoxal soit nécessaire, non plus à la synthèse, mais à la stabilité de la protéine hépatique qui, hors de la cellule, se détruirait rapidement lorsqu'elle n'est pas accompagnée de phosphate de pyridoxal. Cette dernière hypothèse rendrait compte de deux phénomènes observés au cours de nos expériences.

a) l'addition de phosphate de pyridoxal aux suspensions de foie provenant d'animaux normaux n'a en aucun cas augmenté la vitesse initiale de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique; la protéine du foie parait toujours saturée de phosphate de pyridoxal. A la lumière de notre hypothèse, on peut dire qu'il ne peut exister, dans le foie, de protéine de la décarboxylase, sans une certaine quantité de phosphate de pyridoxal, nécessaire à sa stabilité, et suffisante pour assurer l'activité maxima de l'enzyme.

b) si l'addition de phosphate de pyridoxal aux suspen-

sions de foie n'augmente pas la vitesse initiale de la décarboxylation, on a souvent constaté que cette vitesse était conservée plus longtemps par les milieux auxquels on a ajouté du phosphate de pyridoxal - (Cette constatation a été faite dans le cas de préparations de foie peu actives, dont l'activité diminue souvent bien avant l'épuisement du substrat).

Cette nécessité de la présence du phosphate de pyridoxal pour la stabilité de la protéine de la décarboxylase hépatique ne semblerait pas intervenir dans le cas de la décarboxylase du cerve . L'hypothèse de l'existence de deux protéines, différentes selon l'organe, peut être envisagée. On peut aussi retenir l'hypothèse d'une protéine identique dans les deux cas : dans le cerveau, la protéine est stabilisée à la fois par le phosphate de pyridoxal et par son substrat propre, lequel, nous l'avons vu, existe dans cet organe et n'y est que lentement métabolisé. Dans le foie, la disparition rapide du substrat nécessite la présence constante de phosphate de pyridoxal pour la stabilité de l'enzyme.

Un autre résultat intéressant de notre travail dans ce même domaine est la mise en évidence de la réversibilité de la carence en vitamine B_6 : en redonnant de la pyridoxine à des animaux carencés, on régénère l'enzyme de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique.

IV - La carence en vitamine B_6 a également une répercussion dans les phénomènes de transamination auxquels participe l'acide cystéinesulfinique. Cette répercussion est limitée, puisque, seule des trois transaminations étudiées (Acide cystéinesulfinique - Acide α-cétoglutarique, Acide glutamique - Acide Pyruvique, Acide cystéinesulfinique -

Acide Pyruvique), la transamination Acide Cystéinesulfinique-Acide Pyruvique est affectée par la carence en question. Ce fait est néanmoins important car il est en faveur d'une transaminase directe Acide Cystéinesulfinique-Acide Pyruvique, ce qui est contraire à la conception classique des transaminations, mais est en accord avec les résultats de Rowsell (34) prouvant que, dans le foie du rat, le pyruvate peut fonctionner directement comme accepteur du groupement aminé provenant de plusieurs acides aminés.

V - L'étude de la comparaison des décarboxylations et des transaminations subies par l'acide L-cystéinesulfinique et par l'acide L-cystéique dans l'organisme, souligne encore l'importance de l'acide cystéinesulfinique dans le métabolisme des acides aminés soufrés. Cette importance est déjà théoriquement très grande, car cet acide représente une étape unique d'oxydation où la molécule

- ou bien peut perdre son atome de soufre
- ou bien peut être décarboxylée.

Il ressort en effet de l'ensemble des études faites sur la dégradation des acides aminés soufrés (35) que

1) le détachement du soufre peut avoir lieu lorsque la molécule soufrée est sous trois formes

a) et b) formes R. SH et R.S.S.R (cystéine, cystine, homocystéine)

la libération du soufre est effectuée par la désulfurase.

c) forme R SO_2H (acide cystéinesulfinique)

le détachement du soufre est ici précédé nécessairement d'une transamination (3)

Les formes plus oxydées en R.SO_3H ne peuvent pas subir de désulfonation. Ni l'acide cystéique, comme il avait été vu déjà (38), et comme nous l'avons cons-

taté nous-mêmes, ni aucun acide sulfonique aliphatique (méthanesulfonique, iodométhanesulfonique, iséthionique, taurine) (39), ne peuvent donner lieu à une formation de sulfate, le soufre, totalement oxydé à l'intérieur de la molécule, ne semblant pas pouvoir alors se détacher de la chaîne carbonée.

2) La décarboxylation de la molécule soufrée, aboutissant finalement à la taurine, est effectuée uniquement aux stades suivants

a) forme $R_2SO.SO.R$ (cystine disulfoxyde), comme il a été montré par Virtue et Doster-Virtue (40) et par Medes et Floyd (2)

b) forme $R\ SO_3\ H$. (acide cystéique) dont la décarboxylation a été étudiée par Blaschko (29)

c) forme $R\ SO_2\ H$ (acide cystéinesulfinique).
On voit donc que seule la forme $R\ SO_2\ H$ est commune aux deux modes de dégradation

Or, notre travail souligne le fait que, non seulement l'acide cystéinesulfinique participe à la fois à la genèse du sulfate et de la taurine, mais encore qu'il représente, dans l'un et l'autre cas, la voie principale de formation de ces substances dans l'organisme.

En particulier en ce qui concerne les décarboxylations, nous voyons que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique a lieu à une vitesse toujours plus grande que celle de l'acide cystéique, et qu'elle se produit, non seulement chez les animaux qui possèdent une cystéico-décarboxylase (rat) mais encore chez des animaux qui ne décarboxylent pratiquement pas l'acide cystéique (lapin). Par là, nos résultats confirment tout à fait, et précisent, les observations faites in vivo par Awapara (5), Cavallini (7) et Tabéchian (8) et que nous avons déjà signalées.

Pour la genèse de la taurine comme pour celle des sulfates, l'acide cystéinesulfinique représente donc une étape essentielle. L'équilibre entre ses modes possibles de dégradation relève de systèmes encore non définis. Le seul fait constaté est que cet équilibre est rompu, dans le cas de l'animal carencé en vitamine B_6, au profit de la formation des sulfates, qui assure alors complètement la dégradation de l'acide cystéinesulfinique (8).

RESUME

Les résultats essentiels de notre travail sont les suivants :

1º il a été possible de mettre en évidence l'acide cystéinesulfinique dans le cerveau du rat normal.

2º au moyen d'échangeurs d'ions : alumine "acide", Permutite 50, Amberlite IRA 400, les différents acides aminés formés au cours du métabolisme de l'acide L-cystéinesulfinique ont été séparés ou dosés.

3º l'emploi de ces techniques a permis d'isoler l'hypotaurine (acide 2-aminoéthanesulfinique) résultant de la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique, à partir de son milieu biologique de formation et d'en donner une analyse centésimale correcte.

4º une étude comparative des dégradations enzymatiques subies par l'acide L-cystéinesulfinique et par l'acide L-cystéique a mis en évidence que :

- d'une part, les transaminations auxquelles participe l'acide L-cystéinesulfinique ont des vitesses plus grandes que les transaminations correspondantes de l'acide L-cystéique. Les premières produisent du sulfite in vitro, qui donne du sulfate par oxydation, les secondes ne donnent pas lieu à une formation de sulfate dans les mêmes conditions.
- d'autre part, la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique est constamment plus rapide que celle de l'acide L-cystéique, et se produit dans de plus nombreux tissus. Ce fait, joint à d'autres observations expérimentales développées dans le travail montre que la genèse

de la taurine se fait en majeure partie par la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique, l'hypotaurine produite devant ensuite être oxydée en taurine, et non par la décarboxylation de l'acide cystéique, comme il était classiquement admis jusqu'à présent.

Les décarboxylations de l'acide L-cystéinesulfinique et de l'acide L-cystéique sont toutes deux sous la dépendance du phosphate de pyridoxal. L'activité, in vitro, des organes de l'animal normal est augmentée ou non par l'addition de phosphate de pyridoxal selon la nature de l'organe. Chez l'animal carencé, il y a suppression des décarboxylations, coïncidant avec la disparition de l'hypotaurine et de la taurine dans l'urine; les préparations de foie ne sont pas réactivables, tandis que les préparations de cerveau sont parfaitement réactivables par le phosphate de pyridoxal. Nous discutons la nature de ce phénomène. La disparition de la décarboxylation hépatique est reversible : en redonnant de la vitamine B_6 à des animaux carencés, on régénère l'enzyme.

L'ensemble des données expérimentales souligne le rôle fondamental joué par l'acide cystéinesulfinique dans le métabolisme du soufre.

BIBLIOGRAPHIE

1 - N.W. Pirie - Biochem. J. 28 (1934) 305.

2 - G. Medes et N. Floyd - Biochem. J. 36 (1942) 259.

3 - F. Chatagner - Thèse d'Ingénieur-Docteur.Paris 1953.

4 - M. Heimberg, I. Fridovich et P. Handler. J. Biol. Chem. 204 (1953) 913.

5 - J. Awapara et W.J. Wingo - J.Biol.Chem.203 (1953)189.

6 - J. Awapara - Nature 165 (1950) 76.

7 - D. Cavallini - Journées Biochimiques - Naples 1954.

8 - H. Tabéchian - Thèse d'Université - Paris 1953.

9 - T.F. Lavine - J. Biol. Chem. 113 (1936) 580 - 583.

10 - C.E. Dalgliesh - Biochem. J. 52 (1952) 3.

11 - B. Alexander et G. Seligman - J. Biol. Chem. 159 (1945) 9.

12 - G. Toennies et J.J. Kolb. Anal.Chem.23 (1951) 823.

13 - J. Awapara et B. Seale - J.Biol.Chem.194 (1952) 497.

14 - M.F.S. El Hawary et R.H.S. Thompson. Biochem.J.53 (1953) 340.

15 - S. Markees - Biochem. J. 56 (1954) 703.

16 - T. Wieland et E. Fischer - Naturwissenschaften 36 (1949) 219.

17 - D.D. Van Slyke et J. Neill. J.Biol.Chem.61 (1924)523. J.Biol.Chem.83 (1929)425.

18 - T. Wieland - Z.Physiol.Chem. 273 (1942) 24.

19 - C. Fromageot, M. Jutisz et E. Lederer Biochim. Biophys. Acta 2 (1948) 487.

20 - P. Boulanger et G. Biserte - Bull.Soc.Chim.Biol. 33 (1951) 1930.

21 - S.M. Partridge et R.C. Brimley- Biochem.J.49 (1951)153

22 - K.A. Piez, E.B. Tooper et L.S. Fosdick - J. Biol. Chem. 194 (1952) 669.

23 - J. Awapara, A.J. Landua et R. Fuerst - Biochim. Biophys. Acta 5 (1950) 457.

24 - G. Toennies et R.P. Homiller - J. Am. Chem. Soc. 64 (1942) 3054.

25 - M.P. Schubert - J. Am. Chem. Soc. 55 (1953) 3336.

26 - J. Awapara - J. Biol. Chem. 203 (1953) 183.

27 - H. Blaschko, S.P. Datta et H. Harris - Biochem. J. 54 (1953) XVII.

28 - W.J. Wingo et J. Awapara - J.Biol. Chem. 187 (1950) 267.

29 - H. Blaschko - Advances in Enzymology - Vol V p. 75

30 - F. Schlenk et E.E. Snell - J. Biol.Chem. 157 (1945) 425.

31 - J.R. Beaton, R.M. Ballantyne, R.E. Lau, A. Steckley et E.W. Mc Henry - J. Biol.Chem. 186 (1950) 93.

32 - J.R. Beaton, J.L. Beare, G.H. Beaton, E.F. Caldwell, G. Ozawa et E.W. Mc Henry - J. Biol.Chem. 207 (1954) 181.

33 - M.G. Kritzmann - Biokhimiya 5 (1940) 281; 8 (1943) 85.

34 - E.V. Rowsell - Nature 168 (1951) 104.

35 - C. Fromageot, dans J.B. Sumner et K. Myrbäck : The Enzymes (Academic Press Inc. New York 1950) Vol. II, première partie, p. 609.

36 - C. Fromageot et P. Desnuelle - Bull. Soc. Chim. Biol. 24 (1942) 1269.

37 - J.P. Greenstein, F.M. Leuthardt. J. Natl. Cancer Inst. 5 (1944) 209

38 - G. Medes et N. Floyd - Biochem. J. 36 (1942) 836.

39 - G.A. Maw - Biochem. J. 55 (1953) 37.

40 - R.W. Virtue et M.E. Doster-Virtue - J. Biol. Chem. 127 (1939) 431.

TABLE DES MATIERES

Pages

Introduction .....

Techniques 1

A - Synthèse de l'acide L-cystéinesulfinique 1

B - Préparation des milieux enzymatiques 1

C - Traitement des animaux carencés en vitamine B_6 2

D - Etude des transaminations 3

E - Etude des décarboxylations 4

F - Chromatographie sur papier 6

. Acides aminés 6

. Acides cétoniques 7

G - Utilisation d'échangeurs d'ions pour la séparation des acides aminés formés au cours du métabolisme de l'acide L-cystéinesulfinique 9

Chapitre I : Mise en évidence de l'acide cystéinesulfinique dans le cerveau du rat normal 18

Chapitre II : Isolement de l'hypotaurine à partir de son milieu biologique de formation 22

Chapitre III : Etude de la décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique 31

Rôle du phosphate de pyridoxal 38

Etude comparée des décarboxylations de l'acide L-glutamique, de l'acide L-cystéinesulfinique et de l'acide L-cystéique 47

Chapitre IV : 54

Rôle du phosphate de pyridoxal dans les transaminations de l'acide L-cystéinesulfinique 56

Etude comparée des transaminations de l'acide L-cystéinesulfinique et de l'acide L-cystéique 59

Conclusions : 64

Résumé : 71

Bibliographie : 73

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LE ROLE DES GROUPEMENTS SULFHYDRILES DANS LA PHYSIOLOGIE NORMALE ET DANS LA PHYSIOLOGIE PATHOLOGIQUE CHEZ LES PLANTES

Vu et approuvé :

Paris, le 11 Juin 1954.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH.